

Inaugural-Dissertation

**zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg**

vorgelegt von

Diplom-Biologin Denise Holtkotte
aus Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Rolle des C-Terminus von Env in der HIV-1-Infektion und -Replikation

Gutachter: Prof. Dr. Valerie Bosch
Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2001 bis November 2004 am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg unter Leitung von Frau Prof. Dr. Valerie Bosch angefertigt.

DANKSAGUNG

In erster Linie möchte ich mich hiermit ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Valerie Bosch für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die intensive persönliche Betreuung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich danke ich für seine Bereitschaft, das Koreferat zu übernehmen.

Den Mitgliedern des Labors 2.119, insbesondere Tanya Pfeiffer und Thorsten Pisch, sei für ihre tatkräftige Unterstützung und eine schöne Arbeitsatmosphäre gedankt.

Auch allen anderen Mitarbeitern des Forschungsschwerpunkts *Infektion und Krebs*, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich hiermit danken.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern Barbara und Hans Holtkotte aussprechen, die mir auf meinem bisherigen Weg immer liebe- und verständnisvoll zur Seite standen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, Einsichten in die Rolle des ungewöhnlich langen C-Terminus von HIV-1-Env (Env-CT) in der Infektion und Replikation zu gewinnen. Es ist bisher nicht bekannt, aus welchen Gründen die Länge des Env-CTs *in vivo* streng konserviert ist und Virusmutanten mit trunkierten Env-CTs *in vitro* einen Replikationsblock in nicht-permissiven Zellen aufweisen.

Der für die Mutante pNL-Tr712 schon gezeigte Zelltyp-abhängige Defekt hinsichtlich der Replikationskompetenz wurde in nicht-permissiven H9-Zellen bestätigt und auf weitere HIV-1-Derivate mit Trunkationen in Env-CT und Mutationen in Env-TMD ausgedehnt. Bezüglich der Permissivität einiger weniger Zelllinien, z.B. MT-4-Zellen, für Virusmutanten mit trunkierten Env-CTs wurde gezeigt, daß ein permissiver Phänotyp wahrscheinlich nicht auf deren HTLV-1-Tax-Expression beruht und auch nicht durch Expression des Env-CTs *in trans* in nicht-permissiven H9-Zellen induziert werden kann.

Im Fall der Mutante pNL-Tr752 konnte ein einziger Aminosäureaustausch den durch die Trunkation des Env-CTs induzierten Zelltyp-spezifischen Replikationsblock kompensieren: pNL-Tr752(N750K) war in der Lage, trotz trunkiertem Env-CT in nicht-permissiven H9-Zellen und PBMCs zu replizieren. Dies bedeutet, daß möglicherweise nicht ausschließlich die Länge des Env-CTs, sondern auch dessen Funktionalität und Konformation für eine erfolgreiche HIV-1-Ausbreitung in gewissen Zellsystemen von Bedeutung sind.

Einbau- und Funktionalitäts-Analysen der mutierten Glykoproteine sowie *single round of infection*-Analysen zeigten schließlich, daß aus H9-Zellen freigesetzte zellfreie pNL-Tr752-Virionen nicht prinzipiell *per se* defekt waren. Im Vergleich zu pNL-Wt- oder pNL-Tr752(N750K)-Virionen besaßen zellfreie pNL-Tr752-Virionen aus H9- und MT-4-Zellen eine nur geringfügig reduzierte Infektiosität von 30-50%. Eine wichtige und zentrale Beobachtung war hierbei, daß H9-Zellen im Gegensatz zu MT-4-Zellen generell nur äußerst schlecht von *allen* zellfreien Virionen, inklusive pNL-Wt-Virionen, infizierbar waren.

Da Virusreplikation in Zellen die Summe aus Zell-Zell-Transmission und Infektionsvorgängen durch zellfreie Virionen darstellt, deutet die letzte Beobachtung darauf hin, daß Virusausbreitung in H9-Zellen hauptsächlich durch Zell-Zell-Transmission stattfindet. Es ist somit möglich, daß Virusmutanten mit trunkierten Env-Proteinen deswegen nicht in H9-Zellen replizieren können, da sie einen Defekt bei der Zell-Zell-Transmission aufweisen, der auf dem Fehlen des Env-CTs beruht. Der Env-CT könnte für die Zell-Zell-Transmission von HIV-1 essentielle Funktionen wie etwa die Reorganisation des Zytoskeletts übernehmen, eine Vermutung, die sich darauf stützt, daß identifizierte Bindungspartner des Env-CTs mit dem Zytoskelett assoziiert sind.

Die hier postulierte und bisher nicht beschriebene potentielle Rolle des Env-CTs bei der Zell-Zell-Transmission von HIV-1 liefert somit eine wichtige Basis für zukünftige Studien in diese Richtung.

SUMMARY

The aim of this study was to gain insight into the role of the unusually long C-terminus of HIV-1-Env (Env-CT) in infection and replication. Until now, it has remained unclear why the length of the Env-CT is highly conserved *in vivo* and why mutant virions encoding for truncated Env-CTs exhibit a replication block in non-permissive cells *in vitro*.

The cell-type dependent replication defect, which had already been demonstrated for the mutant pNL-Tr712, was confirmed in non-permissive cells and was expanded to further HIV-1-derivatives carrying truncations in Env-CT and mutations in Env-TMD. With regard to the permissivity of some few cell lines, e.g. MT-4-cells, for the replication of mutant virions encoding for truncated Env-CTs, it was established that the permissive phenotype is most probably not based on their HTLV-1-Tax expression. Furthermore, it was shown that expression of the Env-CT *in trans* could not overcome the non-permissive phenotype of H9-cells.

In the case of the mutant pNL-Tr752 encoding for a truncated Env-CT, it was demonstrated that a single amino acid exchange could compensate for the cell-type dependent replication block: the variant pNL-Tr752(N750K) was able to replicate in non-permissive H9-cells and in PBMCs despite its truncated Env-CT. This means that functional and conformational determinants rather than exclusively the overall length of the Env-CT probably influence the ability of HIV-1 to spread in certain cell systems.

An important finding, based on analyses of mutant Env functionality and incorporation into virions, as well as on single round of infection assays, was that pNL-Tr752-virions were actually only moderately defective *per se*. Thus it was reproducibly demonstrated that cell-free pNL-Tr752-virions, whether produced in non-permissive H9-cells or in permissive MT-4-cells, exhibited only a slightly reduced infectivity of about 30-50% in comparison to pNL-Wt or pNL-Tr752(N750K). A further central finding was that, in contrast to MT-4-cells, H9-cells were only poorly infectible with *any* of the employed cell-free virions, including pNL-Wt-virions.

Since virus replication in cell culture is the sum of cell-free and cell-cell virus transmission, this latter observation points to virus spread in H9-cells occurring predominantly via cell-cell transmission. Thus it is hypothesised that mutant virions encoding for truncated Env-Proteins cannot replicate in these cells since they exhibit a defect in cell-cell transmission due to the lack of the Env-CT. The presence of the Env-CT could potentially be required to mediate the rearrangements of cytoskeletal structures which have been shown to be essential for the process of cell-cell transmission. This proposal is supported by the fact that two of the identified binding partners of the Env-CT are cytoskeleton-associated proteins.

A potential role of the HIV-1-Env-CT in cell-cell transmission has not been described so far. Therefore the present study represents an important basis for future studies in this direction.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 HIV und AIDS	1
1.2 Retroviren	1
1.3 Partikelmorphologie und Genomstruktur von HIV-1	2
1.4 Replikation von HIV-1	3
1.4.1 Die frühe Phase des HIV-1-Replikationszyklus	4
1.4.2 Die späte Phase des HIV-1-Replikationszyklus	5
1.4.3 Regulation der HIV-1-Replikation durch die akzessorischen Proteine	6
1.4.4 Zell-Zell-Transmission von HIV-1	7
1.4.4.1 HIV-1-Transmission von dendritischen Zellen zu T-Zellen	7
1.4.4.2 HIV-1-Transmission von T-Zellen zu T-Zellen	8
1.5 Die HIV-1-Env-Glykoproteine	8
1.5.1 Biosynthese und Struktur von HIV-1-Env	9
1.5.2 Der C-Terminus von HIV-1-Env (HIV-1-Env-CT)	10
1.5.2.1 Eigenschaften des HIV-1-Env-CTs	11
1.5.2.2 HIV-1-Mutanten mit Trunkationen in Env-CT	14
1.6 Zielsetzung	15
2. MATERIAL	17
2.1 Antikörper	17
2.1.1 Primärantikörper	17
2.1.2 Sekundärantikörper	18
2.2 Bakterien	19
2.3 Eukaryotische Zelllinien	19
2.3.1 Adhärente Zellen	19
2.3.2 Suspensionszellen	19
2.4 Enzyme	20
2.5 Nukleinsäuren	21
2.5.1 Plasmide	21
2.5.2 Oligonukleotide	22
2.6 Kits	22
2.7 Größenstandards	22
2.8 Chemikalien und Reagenzien	23
2.9 Puffer und Lösungen	24

2.10 Bakterien- und Zellkulturmedien und -zusätze	26
2.10.1 Bakterienkultur	26
2.10.2 Zellkultur	27
2.11 Geräte	27
2.12 Verbrauchsmaterialien	28
3. METHODEN	29
3.1 Mikrobiologische Methoden	29
3.1.1 Lagerung und Kultur von Bakterien	29
3.1.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien	29
3.1.3 Transformation von <i>E. coli</i>	30
3.2 Molekularbiologische Methoden	30
3.2.1 Plasmid-DNA-Minipräparation	30
3.2.2 Plasmid-DNA-Maxipräparation	31
3.2.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren	32
3.2.3.1 Phenol/Chloroform-Extraktion	32
3.2.3.2 Ethanolfällung	32
3.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
3.2.5 Restriktionsverdau von DNA	33
3.2.6 Dephosphorylierung von 5'-Enden	34
3.2.7 Auffüllen von 5'-Überhängen	34
3.2.8 Ligation	34
3.2.9 Agarosegelelektrophorese	35
3.2.10 DNA-Elution aus Agarosegelen	36
3.2.11 Isolierung zellulärer genomischer DNA	36
3.2.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
3.2.12.1 <i>Nested</i> PCR	38
3.2.12.2 Fusions-PCR	38
3.2.13 DNA-Sequenzierungen	40
3.3 Zellkultur	40
3.3.1 Lagerung und Kultur eukaryotischer Zellen	40
3.3.2 Bestimmung der Zellzahl	41
3.3.3 Transiente Kalzium-Phosphat-Transfektion	41
3.3.4 Aufreinigung von Viruspartikeln durch Ultrazentrifugation	42
3.3.5 Aufkonzentration von Viruspartikeln durch Ultrafiltration	42
3.3.6 Semi-quantitative Zell-Zell-Fusion	43
3.4 Infektionen und Transduktionen	43

3.4.1 Replikation von HIV-1 in T-Zellen und PBMCs	43
3.4.2 VSV-G-vermittelte Infektion von MT-4- und H9-Zellen	44
3.4.3 VSV-G-vermittelte Transduktion von H9-Zellen	45
3.4.4 Quantifizierung der Infektiosität aus MT-4- oder H9-Zellen stammender zellfreier Virionen (<i>single rounds of infection</i>)	46
3.4.4.1 Infektiosität zellfreier Virionen in TZM-bl-Zellen	46
3.4.4.2 Infektiosität zellfreier Virionen in T-Zellen	47
3.5 Proteinanalyse	47
3.5.1 Indirekte Immunfluoreszenz	47
3.5.2 FACS	48
3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
3.5.4 Western Blot und ECL	51
3.5.5 <i>Strippen</i> von gefärbten Western Blot-Membranen	52
3.5.6 Herstellung von Zell- und Viruslysaten (1% Triton X-100)	52
3.5.7 p24-ELISA	53
3.5.8 Nachweis zellulärer β -Galaktosidase-Expression (X-Gal-Assay)	53
3.5.9 Nachweis zellulärer Luziferase-Expression	54
3.5.10 Biotinylierung zellulärer Oberflächen-Proteine	54
4. ERGEBNISSE	56
4.1 HIV-1-Expressionsplasmide	56
4.2 Zelltyp-abhängige Replikation der HIV-1-Mutanten	58
4.2.1 Replikation in C8166- und H9-Zellen	58
4.2.2 Vergleich der Permissivität von MT-4- und C8166-Zellen	61
4.2.3 Versuche zur Aufhebung des nicht-permissiven Phänotyps von H9-Zellen	62
4.2.3.1 Expression von HTLV-1-Tax in H9-Zellen	63
4.2.3.2 Expression des Env-CTs <i>per se</i> in H9-Zellen	66
4.3 Identifikation und Analyse von <i>second site</i> -Mutationen	68
4.3.1 Die Variante pNL-TmCD22'	69
4.3.2 Die Variante pNL-Tr752(N750K)	72
4.3.2.1 Reselektion von pNL-Tr752(N750K)	76
4.3.2.2 Replikation von pNL-Tr752(N750K) in PBMCs	77
4.3.2.3 Die N750K-Mutation im Kontext von pNL-Tr813	78
4.4 Einbau von HIV-1-Env in Virionen	80
4.4.1 Einbau in pNL-Tr752- und pNL-Tr752(N750K)-Virionen	80
4.4.2 Einbau in pNL-Tr712-Virionen und in Virionen der übrigen pNL-Derivate	83

4.5 Untersuchungen zur Funktionalität der mutierten Env-Proteine	85
4.5.1 Semi-quantitative Zell-Zell-Fusion	85
4.5.2 CD4-Unabhängigkeit von pNL-Tr752(N750K)	87
4.5.3 Oberflächenexpression der mutierten Env-Proteine in infizierten H9-Zellen	89
4.6 Quantifizierung der Infektiosität der HIV-1-Mutanten	91
4.6.1 Infektiosität zellfreier Virionen aus MT-4- und H9-Zellen in TZM-bl-Zellen	91
4.6.2 Infektiosität zellfreier Virionen aus MT-4- und H9-Zellen in T-Zellen	93
4.6.2.1 Intrazelluläre FACS-Analysen infizierter T-Zellen	93
4.6.2.2 Messung der p24-Freisetzung aus infizierten T-Zellen	96
4.7 Zellfreie HIV-1-Infektion von H9-Zellen	97
4.7.1 Detektion zellfrei infizierter H9-Zellen	97
4.7.2 Oberflächenexpression zellulärer HIV-1-Rezeptoren und Adhäsions- moleküle in MT-4- und H9-Zellen	98
5. DISKUSSION	100
5.1 Replikation in permissiven und nicht permissiven Zellen	100
5.1.1 Phänotypen der HIV-1-Mutanten	100
5.1.2 Basis der Permissivität von Zelllinien	101
5.1.3 Die potentielle <i>second site</i> -Revertante pNL-TmCD22'	102
5.1.4 Die phänotypische Revertante pNL-Tr752(N750K)	103
5.2 Einbau mutierter Env-Proteine in Virionen	105
5.3 Funktionalität der mutierten Env-Proteine	106
5.4 Infektiosität zellfreier Virionen	109
5.4.1 Quantifizierung der Infektiosität zellfreier Virionen aus MT-4- und H9-Zellen	109
5.4.2 Infizierbarkeit von H9-Zellen durch zellfreie Virionen	111
5.4.3 Oberflächenexpression von HIV-1-Rezeptoren und Adhäsions- molekülen in MT-4- und H9-Zellen	112
5.5 Die Rolle des HIV-1-Env-CTs in der Virusreplikation	113
6. ANHANG	115
6.1 Oligonukleotide	115
6.2 Klonierungsstrategien	117
6.2.1 Generierung von pNL-TmR-I	117
6.2.2 Generierung von pNL-Tr752(N750K)	118
6.2.3 Generierung von pWPI-Env-TMD-CT	119
6.3 Abkürzungen	121
7. LITERATUR	125

1. EINLEITUNG

1.1 HIV und AIDS

Zu Beginn der 80er Jahre kam es in Los Angeles und New York vorwiegend unter jungen homosexuellen Männern zum gehäuften Auftreten eines neuartigen Krankheitsbildes, welches durch Lymphadenopathien und bis dahin eher seltene Neoplasien wie z.B. Kaposi-Sarkome gekennzeichnet war (*Centers for Disease Control*, 1981; Gottlieb *et al.*, 1981; Friedman-Kien *et al.*, 1982). All diesen Patienten war gemeinsam, daß die zelluläre Immunabwehr schwer gestört war, weswegen diese neue Krankheit *acquired immune deficiency syndrome* (AIDS) genannt wurde.

In den Jahren 1983 und 1984 kam es dann fast zeitgleich voneinander durch eine französische und eine US-amerikanische Gruppe zur Isolierung eines bis dahin unbekannten Lentivirus aus Patienten (Barre-Sanoussi *et al.*, 1983; Popovic *et al.*, 1984b; Gallo *et al.*, 1984). Dieses Virus aus der Familie der Retroviren wurde als Erreger von AIDS identifiziert und fortan als *human immunodeficiency virus type one* (HIV-1) bezeichnet. 1986 erfolgte die Isolierung eines verwandten Virus aus einem westafrikanischen AIDS-Patienten, welches HIV-2 genannt wurde (Clavel *et al.*, 1986). Beide Viren lösen das gleiche Krankheitsbild aus (Brun-Vezinet *et al.*, 1987), wobei es in HIV-2-infizierten Individuen im Durchschnitt länger dauert, bis es zum Ausbruch der Krankheit AIDS kommt (Pepin *et al.*, 1991).

HIV hat sich inzwischen zu einer globalen Epidemie entwickelt: weltweit leben derzeit ca. 37,8 Millionen HIV-infizierte Menschen, davon 2,1 Millionen Kinder unter 15 Jahren. Allein 2003 kam es zu 4,8 Millionen HIV-Neuinfektionen und zu 2,9 Millionen Todesfällen. Die global am stärksten betroffene Region sind die südlich der Sahara gelegenen afrikanischen Länder - 67% der 2003 weltweit aufgetretenen Neuinfektionen sind dort lokalisiert (UNAIDS/WHO, Stand Dezember 2003, <http://www.unaids.org>).

Ein Ende der Epidemie ist nicht in Sicht - trotz enormer Fortschritte im Verständnis von Struktur und Replikation des HI-Virus ist es bisher nicht gelungen, ein vor Infektion schützendes Vakzin oder einen Wirkstoff zu entwickeln, der das im Körper befindliche Virus eliminieren kann.

1.2 Retroviren

HIV-1 und HIV-2 werden der Familie der Retroviren zugeordnet, welche eine Gruppe von membranumhüllten Viren mit einem diploiden RNA-Genom positiver Polarität umfasst.

Charakteristisch für Retroviren ist das virale Enzym Reverse Transkriptase (Temin und Mizutani, 1970; Baltimore, 1970), welches sie in die Lage versetzt, den üblichen genetischen Informationsfluß von DNA zu RNA umzukehren – diese Eigenschaft spiegelt sich in der Bezeichnung „Retroviren“ wieder.

Retroviren wurden erstmals Anfang des letzten Jahrhunderts beschrieben und mit der Entstehung von Tumorerkrankungen in Geflügel (Ellerman und Bang, 1908; Rous, 1911) und in Mäusen (Bittner, 1936) in Zusammenhang gebracht. Nach einer Reihe von Isolierungen tierpathogener Retroviren wurde schließlich 1980 mit dem *human T-cell leukemia virus type one* (HTLV-1), welches T-Zell-Leukämien in Menschen hervorruft, das erste humanpathogene Retrovirus beschrieben (Poiesz *et al.*, 1980).

Nach dem *International Committee on Taxonomy of Viruses* werden die Retroviren in die sieben Genera der „einfachen“ Alpha-, Beta- und Gammaretroviren sowie der „komplexen“ Deltaretro-, Epsilonretro-, Lenti- und Spumaviren eingeteilt. Die einfachen Viren besitzen nur *gag*-, *pro*-, *pol*- und *env*-Gene, während das Genom der komplexen Retroviren weitere Gene enthält, die für regulatorische Proteine verschiedenster Funktionen kodieren. HIV-1 ist der bekannteste Vertreter der Lentiviren, denen außerdem weitere Primatenviren wie HIV-2 und SIV (*simian immunodeficiency virus*) sowie zahlreiche Nicht-Primaten-Viren wie EIAV (*equine infectious anemia virus*) oder CAEV (*caprine arthritis-encephalitis virus*) angehören. Infektionsverläufe mit Lentiviren zeichnen sich durch eine prolongierte Latenz zwischen Infektion und klinischer Manifestation aus (lat. *lentus* = langsam).

1.3 Partikelmorphologie und Genomstruktur von HIV-1

Modelle für die Struktur von HIV-1-Virionen basieren auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie biochemischen Analysen der Virionen-Komponenten (Munn *et al.*, 1985; Gelderblom, 1991). Der schematische Aufbau eines HIV-1-Partikels sowie die HIV-1-Genomstruktur sind in Abbildung 1.1 dargestellt.

Reife infektiöse HIV-1-Viruspartikel sind sphärisch, besitzen einen Durchmesser von etwa 110 nm und sind von einer Lipid-Doppelschicht umgeben, welche sich von der Zellmembran der infizierten Zelle ableitet, die das Viruspartikel freigesetzt hat. In der Lipidmembran sind Trimere des viralen Glykoproteins Env eingebettet, die wiederum aus Heterodimeren von Env-SU (gp120) und Env-TM (gp41) bestehen.



Abb. 1.1: Partikelmorphologie und Genomstruktur von HIV-1.

Die Größen und Lokalisationen der Proteine bzw. Genabschnitte sind schematisch dargestellt und nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. Nähere Erläuterungen sind im Text zu finden.

Direkt unter der Lipidschicht liegt eine netzartige Proteinschicht aus Matrix-Proteinen (MA, p17), die über Myristinsäurereste mit der Lipidschicht verbunden sind. Im Zentrum des Virions befindet sich das Kapsid, auch *core* genannt, bestehend aus Kapsid-Proteinen (CA, p24) und Nukleokapsid-Proteinen (NC, p7). Letztere sind eng mit dem viralen RNA-Genom assoziiert. Als weitere virale Proteine befinden sich im Virion die Enzyme Reverse Transkriptase (RT, p66/p51), Integrase (IN, p32), Protease (PR, p11) sowie Vpr.

HIV-1 wird als Vertreter der Lentiviren zu den komplexen Retroviren gezählt, deren Genom neben des klassischen retroviralen Genen *gag*, *pol* und *env* die regulatorischen Gene *tat* und *rev* sowie die akzessorischen Gene *nef*, *vif*, *vpr* und *vpu* enthält. Das RNA-Genom von HIV-1 besteht aus zwei Kopien einzelsträngiger RNA positiver Polarität mit einer Länge von ~9,2 kb. Jeweils an deren 5'-Ende ist ein Transfer-RNA^{Lys}-Molekül positioniert, welches als *Primer* für die Reverse Transkriptase fungiert. Wie bei allen Retroviren wird bei HIV-1 durch die Reverse Transkriptase eine provirale doppelsträngige DNA erzeugt, die jeweils am 5'- und 3'-Ende von LTRs (*long terminal repeats*) flankiert ist, welche regulatorische Sequenzen enthalten.

1.4 Replikation von HIV-1

Der Replikationszyklus von HIV-1 lässt sich in eine frühe und eine späte Phase unterteilen, deren einzelne Abschnitte in Abb. 1.2 dargestellt sind: die frühe Phase beginnt mit der Adsorption von HIV-1-Virionen an Zelloberflächenrezeptoren und dem Eintritt der Virionen in die Zelle, gefolgt von reverser Transkription und Integration der proviralen DNA in das zelluläre Genom. Die späte Phase beginnt mit der Transkription und Prozessierung viraler RNA und endet mit der Freisetzung reifer infektiöser Partikel.

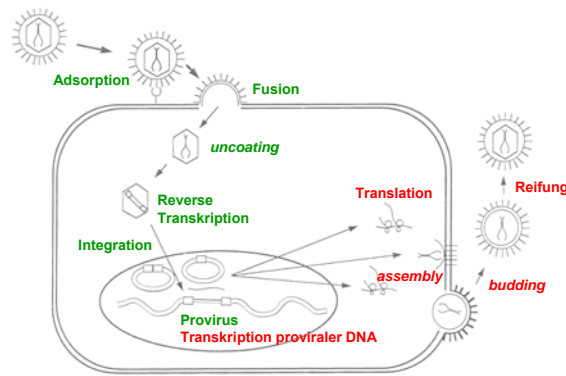


Abb. 1.2: HIV-1- Replikationszyklus.

Frühe Schritte der Replikationsphase sind in grün, späte Schritte in rot dargestellt.

Verändert nach Coffin (1996).

1.4.1 Die frühe Phase des HIV-1-Replikationszyklus

Die Adsorption von HIV-1 an permissive CD4-positive T-Zellen wird durch die Interaktion von gp120 an den zellulären primären HIV-1-Rezeptor CD4 vermittelt (Klatzmann *et al.*, 1984; Lasky *et al.*, 1987). Durch diese Interaktion kommt es zu einer Konformationsänderung in gp120 (Sattentau und Moore, 1991), die es dem Virus erlaubt, an seine Korezeptoren zu binden (Trkola *et al.*, 1996; Kwong *et al.*, 1998). Zwölf Chemokinrezeptoren können *in vitro* als HIV-1-Korezeptoren dienen, von denen nur zwei, nämlich CXCR4 und CCR5, *in vivo* eine Rolle spielen (Doms und Trono, 2000). Nach Korezeptorbindung kommt es zur gp41-vermittelten Fusion der viralen und zellulären Membranen und dem Eintritt des HIV-1-Kapsids in die Zelle (Brasseur *et al.*, 1988; Chan und Kim, 1998; Gallo *et al.*, 2003; Pierson und Doms, 2003).

In der Zelle kommt es zum noch nicht vollständig verstandenen Prozeß des kontrollierten Zerfalls des viralen Kapsids (*uncoating*) und zur reversen Transkription der viralen RNA innerhalb des sogenannten Präintegrationskomplexes (PIC). Dieser besteht aus der viralen doppelsträngigen cDNA, IN, MA, Vpr, und RT (Miller *et al.*, 1997) und bewegt sich möglicherweise an Mikrotubuli entlang auf den Nukleus zu (McDonald *et al.*, 2002).

Im Gegensatz zu einfachen Retroviren besitzt HIV-1 die Eigenschaft, ausdifferenzierte Zellen zu infizieren (Weinberg *et al.*, 1991) und die Fähigkeit, sein genetisches Material aktiv durch die Kernporen der intakten Kernmembran zu schleusen. Dieser Prozeß wird durch Kernlokalisierungssequenzen in den mit dem PIC assoziierten Proteinen IN (Gallay *et al.*, 1997), MA (Bukrinsky *et al.*, 1993) sowie Vpr (Heinzinger *et al.*, 1994) vermittelt. Im Nukleus wird die doppelsträngige virale DNA mit Hilfe von IN als Provirus in das Wirtszellgenom integriert, wobei eine gerichtete Integration in transkriptionell aktive Bereiche diskutiert wird (Schröder *et al.*, 2002).

1.4.2 Die späte Phase des HIV-1-Replikationszyklus

Die chromosomale Umgebung der Integrationsstelle bestimmt die transkriptionelle Aktivität des Provirus (Jordan *et al.*, 2001), so kann etwa Integration in Heterochromatin zu Latenz führen. Die Transkription der viralen Gene durch die zelleigene Transkriptionsmaschinerie der RNA-Polymerase II wird vom 5'-LTR initiiert. Dieser enthält zahlreiche *cis*-regulatorische Sequenzen wie etwa Bindestellen für die zellulären Transkriptionsfaktoren NF- κ B (Nabel und Baltimore, 1987) und Sp1 (Jones *et al.*, 1986). Die Bindung des regulatorischen Proteins Tat an das TAR (*trans-activating response*)-Element des entstehenden RNA-Transkripts nach Transkriptionsinitiation ist für eine erfolgreiche Elongation essentiell. Tat interagiert mit einem Heterodimer aus Cyclin T1 und CDK9, das eine Komponente des im Nukleus vorkommenden Transkriptions-Elongationskomplexes P-TEFb ist (Zhu *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 1998). Diese Interaktion induziert konformationelle Änderungen in Tat und erhöht dessen Affinität und Spezifität für die Bindung an das TAR-Element (Zhou *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 1998). Diese Rekrutierung von Cyclin T1 und CDK9 in die Nähe des Promotors hat eine Hyperphosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II durch CDK9 und somit eine erfolgreiche Elongation des RNA-Transkripts zur Folge (Price, 2000).

Es werden über 20 verschiedene virale mRNAs synthetisiert (Saltarelli *et al.*, 1996), von denen zunächst ausschließlich nur mehrfach gespleißte Transkripte ins Zytosplasma transportiert werden, die für die viralen Proteine Tat, Rev und Nef kodieren (auch frühe Genprodukte genannt). Rev ist ein nukleärer Exportfaktor, der beim Erreichen einer kritischen Konzentration im Nukleus an das im *env*-Transkript lokalisierte RRE (*rev response element*) bindet, und so den Transport von einfach und ungespleißten Transkripten, die für die so genannten späten Genprodukte kodieren, durch die nukleären Poren ins Zytoplasma vermittelt (Malim *et al.*, 1990; Fischer *et al.*, 1994; Cullen, 1998). Dieser Prozeß beinhaltet u.a. die Rekrutierung des zellulären RanGTP-abhängigen Kernexportfaktors Crm-1 durch Rev (Neville *et al.*, 1997).

Von einfach gespleißten Transkripten werden die Envelope-Glykoproteine (siehe 1.5) sowie die akzessorischen HIV-1-Proteine Vif, Vpu und Vpr synthetisiert (siehe 1.4.3). Die Syntheseprodukte ungespleißter Transkripte sind das Gag-Vorläuferprotein (Pr55^{Gag}) sowie das Gag-Pol-Vorläuferprotein (Pr160^{Gag-Pol}), das durch einen ribosomalen *frameshift* während der Translation der Gag-RNA entsteht: in 5% der Fälle verschieben sich die Ribosomen an einer besonderen RNA-Sekundärstruktur der Gag-RNA (Parkin *et al.*, 1992) in den *pol*-Leserahmen, ohne daß die Translation terminiert (Jacks *et al.*, 1988). Pr55^{Gag} und Pr160^{Gag-Pol} werden bereits während der Translation N-terminal myristyliert (Wilcox, 1987; Veronese *et al.*, 1988), was für deren stabile Assoziation mit der Plasmamembran essentiell (Göttlinger *et*

al., 1989, Bryant und Ratner, 1990), aber nicht ausreichend ist: weitere basische Sequenzen in der MA-Domäne interagieren mit der Innenseite der Plasmamembran und stabilisieren die Gag-Bindung (Massiah *et al.*, 1994).

Die Partikelmorphogenese umfaßt die Bindung zweier viraler RNA-Genome über das 120 bp jenseits des 5'-LTRs gelegene RNA-Verpackungssignal Ψ (Clavel und Orenstein, 1990; Luban und Goff, 1994) an membranassoziierte Pr55^{Gag} - und Pr160^{Gag-Pol}-Moleküle. Die Rekrutierung essentieller zellulärer Faktoren wie Tsg101 und dessen Bindung an die L-Domäne von p6 (Garrus *et al.*, 2001) führt schließlich zum Abschnürungsprozeß unreifer viraler Partikel. Die Reifung der Virionen wird durch die virale Protease vermittelt, die nach ihrer Dimerisierung Pr55^{Gag} in die reifen Gag-Proteine Matrix (MA), Kapsid (CA), Nukleokapsid (NC) und p6 und die beiden *Spacer*-Peptide p2 und p1 spaltet (Kramer *et al.*, 1986). Zusätzlich werden im Kontext von Pr160^{Gag-Pol} die Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) freigesetzt. Protease-defekte unreife Viruspartikel sind nicht infektiös (Kohl *et al.*, 1988).

1.4.3 Regulation der HIV-1-Replikation durch die akzessorischen Proteine

Die akzessorischen HIV-1-Proteine Nef, Vpr, Vpu und Vif werden in einigen *in vitro*-Systemen nicht für eine erfolgreiche Replikation benötigt, sind aber kritisch für die Virulenz *in vivo*.

Nef wird im Rahmen der frühen Genexpression synthetisiert und verändert die Umgebung der infizierten Zelle zum Vorteil für HIV-1 im Sinne einer Virulenzsteigerung (Kestler *et al.*, 1991). Als wichtigste Funktionen von Nef seien das Herunterregulieren von CD4- und MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche sowie seine Eigenschaft, in zelluläre Signalkaskaden einzugreifen, genannt (Doms und Trono, 2000; Geyer *et al.*, 2001).

Die späten Genprodukte Vpr, Vpu und Vif werden von einfach gespleißten Transkripten synthetisiert. Vpr wird durch Bindung an die p6-Domäne von Gag in HIV-1-Virionen eingebaut (Cohen *et al.*, 1990; Paxton *et al.*, 1993). Vpr ist mit dem PIC assoziiert und ist an dessen Transport in den Kern beteiligt (Heinzinger *et al.*, 1994), des weiteren vermittelt Vpr eine Blockade der Zellproliferation durch einen Arrest des Zellzyklus in der G2-Phase (Rogel *et al.*, 1995; Jowett *et al.*, 1995).

Vpu vermittelt die Degradierung von CD4 im Endoplasmatischen Retikulum (Willey *et al.*, 1992) und wird für eine effiziente Virionenreifung und -freisetzung benötigt (Klimkait *et al.*, 1990).

Vif unterbindet die Aktivität des zellulären antiretroviralen Faktors APOBEC3G (Sheehy *et al.*, 2002). Durch Anwesenheit dieses Proteins in HIV-1-Virionen kommt es nach Eintritt in die infizierte Zelle zu Deaminierungen (C→U) in der Minusstrang-DNA viraler reverser Transkripte, was zu Degradierungen der viralen cDNA (Simon und Malim, 1996) oder zu Fixierung letaler Hypermutationen (Zhang *et al.*, 2003) führen kann. Vif komplexiert mit APOBEC3G (Mariani *et al.*, 2003) und induziert dessen Degradierung im Proteasom (Marin *et al.*, 2003), so daß keine Enkapsidierung von APOBEC3G in neugebildete Virionen stattfinden kann.

1.4.4 Zell-Zell-Transmission von HIV-1

HIV-1 breitet sich neben Infektionsvorgängen, die durch zellfreie Virionen vermittelt werden, auch über Zell-Zell-Transmission in einem Organismus aus (Phillips, 1994). Zell-Zell-Transmission ist bereits für andere Viren, Bakterien und intrazelluläre Parasiten dokumentiert (Johnson *et al.*, 2002; Cossart und Sansonetti, 2004; Sibley, 2004). Im Fall von HIV-1 ist der Mechanismus der Zell-Zell-Transmission jedoch momentan weitaus weniger verstanden als die Ausbreitung über zellfreie Virionen. Möglicherweise spielt die Zell-Zell-Transmission von HIV-1-Virionen *in vivo* eine übergeordnete Rolle, da HIV-1 so der Neutralisierung durch Antikörper oder durch das Komplementsystem eher entkommen kann (Gupta *et al.*, 1989; Ganesh *et al.*, 2004). Zell-Zell-Transmission von HIV-1 ist in der Literatur vor allem für die Transmission von HIV-1-Virionen von dendritischen Zellen zu T-Zellen und von T-Zellen zu T-Zellen beschrieben worden. Für den Bereich des Zell-Zell-Kontakts, an dem HIV-1 von der Effektorzelle an die Zielzelle weitergegeben wird, etabliert sich in der Literatur momentan der Begriff der sogenannten „virologischen Synapse“ (Piguet und Sattentau, 2004).

1.4.4.1 HIV-1-Transmission von dendritischen Zellen zu T-Zellen

HIV-1-Virionen können mit auf der Virushülle befindlichem gp120 an bestimmte C-Typ-Lektine auf der Oberfläche dendritischer Zellen binden (Turville *et al.*, 2002). Das in diesem Kontext am besten charakterisierte Lektin ist DC-SIGN (Geijtenbeek *et al.*, 2000). Auch die Bindung von HIV-1 an den Mannose-Rezeptor auf der Oberfläche von Makrophagen (MMR) wurde beschrieben (Nguyen und Hildreth, 2003). Bindung von HIV-1 an diese Moleküle führt zu keiner produktiven Infektion der jeweiligen Zelle, sondern zu einer Internalisierung der Virionen in Trypsin-resistente Zellkompartimente (Kwon *et al.*, 2002). Daraufhin erfolgt der

effiziente Transfer der internalisierten Virionen zu CD4-positiven Zielzellen (Sanders *et al.*, 2002). Die Modellvorstellung geht davon aus, daß HIV-1-Virionen diese Zellen als Vehikel benutzen, um von der an der Peripherie gelegenen Eintrittsstelle in den Organismus zu T-Zell-reichen Geweben wie den Lymphknoten zu gelangen. Am direkten Zellkontakt kommt es dann zu einer lokalen Konzentrierung von Virionen in der Effektorzelle und den HIV-1-Rezeptoren CD4 bzw. CXCR4 und CCR5 in der Zielzelle, gefolgt von Transmission von HIV-1-Virionen, weswegen in diesem Kontext auch von der Ausbildung einer infektiösen synaptischen Verbindung gesprochen wird (McDonald *et al.*, 2003).

1.4.4.2 HIV-1-Transmission von T-Zellen zu T-Zellen

Auch im Kontext der Zell-Zell-Transmission von produktiv infizierten zu uninfizierten T-Zellen wurde die Konzentration gewisser Moleküle im Bereich des Zell-Zell-Kontakts beschrieben. Die Bindung von an der Oberfläche der Effektorzelle exprimiertem gp120 an CD4 vermittelt die Aktin-abhängige Rekrutierung der HIV-1-Rezeptoren und des Adhäsionsmoleküls LFA-1 in der Zielzelle sowie die Rekrutierung von Env- und Gag-Molekülen in der Effektorzelle. Dies führt zur Ausbildung einer stabilen adhäsiven Verbindung zwischen beiden Zellen, über die HIV-1 die Zielzelle infizieren kann (Jolly *et al.*, 2004). Für Zell-Zell-Transmission von HTLV-1 wurde in diesem Kontext auch die Reorganistaion des MTOC (*microtubule organising centre*) in der Effektorzelle beschrieben (Igakura *et al.*, 2003), möglicherweise spielt dieser Mechanismus auch bei HIV-1 eine Rolle. Es wird angenommen, daß diese Art der Virusübertragung vor allem in T-Zell-reichen Geweben eine wichtige Rolle spielt, da der zeitlimitierende Faktor der Virusdiffusion unterbunden wird (Piguet und Sattentau, 2004).

1.5 Die HIV-1-Env-Glykoproteine

Die im Verlauf der Replikation an der Oberfläche infizierter Zellen exprimierten Envelope-Glykoproteine werden beim Abschnürungsprozeß in HIV-1-Virionen eingebaut. Hierbei ist ihre Anwesenheit im Gegensatz zu anderen membranumhüllten Viren nicht für die Freisetzung von Virionen notwendig, jedoch ist die Präsenz der Glykoproteine in der Virionenhülle für die Vermittlung von Rezeptorbindung und Fusion mit Zielzelle von essentieller Bedeutung.

1.5.1 Biosynthese und Struktur von HIV-1-Env

Das *env*-Gen von HIV-1 kodiert für ein 856 Aminosäuren langes Protein, welches in der späten Phase der Genexpression ausgehend von einfach gespleißten Transkripten am rauen Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert wird. Es kommt bereits ko- und posttranslational zu umfangreichen Glykosylierungen, wodurch die 160 kDa großen Env-Vorläuferproteine entstehen (Allan *et al.*, 1985; Veronese *et al.*, 1985). Kurz nach der Synthese binden die gp160-Proteine im Endoplasmatischen Retikulum an zelluläre BiP/GRP78-Chaperone, bilden Disulfidbrücken aus und oligomerisieren zu Dimeren (Willey *et al.*, 1988; Earl *et al.*, 1990; Earl *et al.*, 1991b). Dieser Vorgang scheint für den Transport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Komplex essentiell zu sein (Willey *et al.*, 1991). Im Golgi-Komplex werden einige der N-glykosidisch mit Asparaginen verknüpften Mannose-Ketten zu komplexeren Formen modifiziert (Leonard *et al.*, 1990). Anschließend wird gp160 in diesem Kompartiment durch eine zelluläre Protease, meist Furin (Hallenberger *et al.*, 1992), in gp120 (Env-SU) und gp41 (Env-TM) gespalten, ein Prozeß, der für die Fusogenität des Env-Proteins essentiell ist (McCune *et al.*, 1988). Die proteolytische Spaltung läuft ineffizient ab, und der größte Teil von gp160 wird in Lysosomen degradiert (Willey *et al.*, 1988).

Die beiden Env-Domänen gp120 und gp41 bleiben nicht-kovalent miteinander assoziiert (Helseth *et al.*, 1991). gp120 ist ein hochglykosyliertes hydrophiles Protein, welches an der externen Oberfläche von Virionen- und Zellmembranen exponiert ist. gp120 enthält die Bindestelle für den zellulären HIV-1-Rezeptor CD4 (Lasky *et al.*, 1987) sowie fünf hypervariable Regionen (V1-V5), unterbrochen von fünf konservierten Regionen (C1-C5) (Starcich *et al.*, 1986). Die Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken ist für die Lokalisierung von V1-V4 in großen schleifenartigen Strukturen verantwortlich (Leonard *et al.*, 1990), wobei die V3-Schleife einen Teil der Korezeptorbindestelle darstellt und damit die Determinante für den Zelltropismus enthält (Milich *et al.*, 1993). Durch die erfolgreiche Kristallisierung einer sogenannten *core*-Domäne von gp120 konnten weitere detaillierte Einsichten in die Struktur dieses Proteins gewonnen werden (Kwong *et al.*, 1998; Wyatt *et al.*, 1998).

Env ist über gp41, ein Typ-I-Membranprotein, in der viralen bzw. zellulären Membran verankert. In der extrazellulären gp41-Domäne sind für die Oligomerisierung von Env essentielle Bereiche lokalisiert (Earl und Moss, 1993). Am N-terminalen Ende von gp41 befindet sich das 16 Aminosäuren lange Fusionspeptid (Freed *et al.*, 1990), welches nach Rezeptor- und Korezeptorbindung exponiert und in die Membran der Zielzelle inseriert wird (Wyatt und Sodroski, 1998). C-terminal vom Fusionspeptid gelegen befinden sich zwei

amphipatische helikale Bereiche, N- und C-Helix genannt, die eine zentrale Rolle in der Membranfusion spielen. Strukturanalysen zeigen, daß die N-Helices im trimerischen gp41 in einer sogenannten *coiled coil*-Struktur vorliegen. Nach Rezeptorbindung kommt es zu konformationellen Änderungen in der gp41-Ektodomäne, die für die Membranfusion essentiell sind (Furuta *et al.*, 1998), und infolge derer die N-Helices mit den C-Helices unter Ausbildung der sogenannten *six helix bundle*-Struktur interagieren. Diese extrem stabile Struktur besteht aus einer inneren *coiled coil*-Domäne aus N-Helices sowie den drei antiparallelen C-Helices, welche sich in hydrophobe Furchen auf der Außenseite der *coiled coil*-Domäne einlagern (Weissenhorn *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1997). Die Ausbildung dieser Struktur bringt virale und zelluläre Membranen zum Zweck der Fusion in unmittelbare Nähe (Gallo *et al.*, 2003; Colman und Lawrence, 2003).

Auf die zytoplasmatische C-terminale Domäne von HIV-1-Env (HIV-1-Env-CT) wird im nächsten Kapitel genauer eingegangen.

1.5.2 Der C-Terminus von HIV-1-Env (HIV-1-Env-CT)

Eine Eigenschaft lentiviraler Envelope-Glykoproteine, welche sie von den Glykoproteinen anderer membranumhüllter Viren abgrenzt, ist das Vorhandensein einer außergewöhnlich langen C-terminalen zytoplasmatischen Domäne (HIV-1-Env-CT). Abbildung 1.3 zeigt den Längenvergleich verschiedener retroviraler Env-CTs.

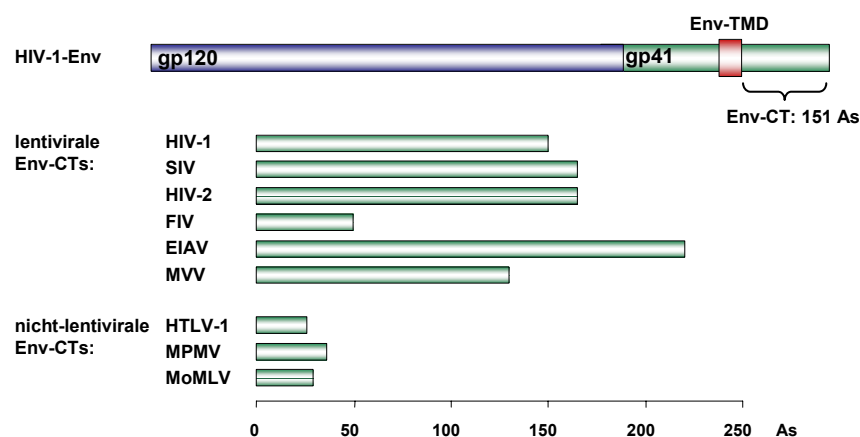


Abb. 1.3: Längenvergleich verschiedener retroviraler Env-CTs.

Die Abbildung stellt die verschiedenen Längen der Env-CTs verschiedener Retroviren schematisch im Vergleich zueinander dar. TMD = Transmembrandomäne, As = Aminosäuren.

Mit Ausnahme von FIV besitzen lentivirale Retroviren Env-CTs von über 100 Aminosäuren, während nicht-lentivirale Retroviren relativ kurze Env-CTs mit einer Länge von maximal ca. 50 Aminosäuren besitzen (Gallaher *et al.*, 1989; Hunter und Swanstrom, 1990). Auch membranumhüllte Viren anderer Familien besitzen Glykoproteine mit nur kurzen C-Termini, so ist z.B. der CT von Influenza-HA nur zehn Aminosäuren lang. Die Länge des HIV-1-Env-CT ist *in vivo* hoch konserviert. Bis heute wurde nur ein einziges Mal ein aus einem AIDS-Patienten stammendes HIV-1-Isolat beschrieben, welches für einen verkürzten Env-CT kodierte (Shimizu *et al.*, 1990; Shimizu *et al.*, 1992). Dies führt zu der Annahme, daß der HIV-1-Env-CT voller Länge für den lentiviralen Replikationszyklus von essentieller Bedeutung sein muß.

1.5.2.1 Eigenschaften des HIV-1-Env-CTs

Obwohl viele Eigenschaften und funktionelle Bereiche des HIV-1-Env-CTs identifiziert werden konnten, ist bis heute nicht klar, was der genaue Grund für die absolute *in vivo*-Konservierung des offenen HIV-1-Env-CT-Leserahmens ist. Einige wichtige Bereiche des HIV-1-Env-CTs sind in Abb. 1.4 dargestellt.

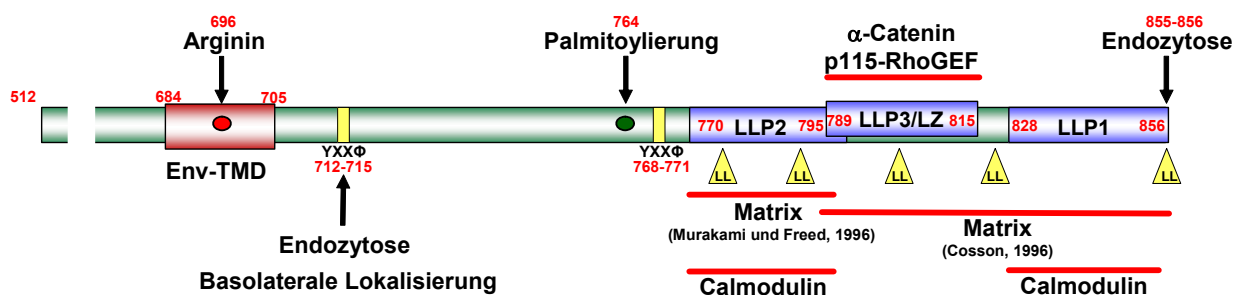


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des HIV-1-Env-CTs.

Abgebildet ist die gp41-Untereinheit von Env, wobei die extrazelluläre Domäne verkürzt dargestellt ist. Die roten Zahlen geben relevante Aminosäurepositionen wieder. Die roten Linien unter/über dem Protein stellen die Interaktionsbereiche mit den jeweils dort genannten Proteinen dar. Potentielle Endozytosesignale sind mit gelben Balken (YXXΦ) bzw. Dreiecken (LL) dargestellt. Detaillierte Informationen zu den hier dargestellten Motiven und Bereichen sind im Text zu finden. TMD = Transmembrandomäne, LLP = *lentiviral lytic peptide*, LZ = *leucine zipper*.

Der Membrananker besteht im Fall von HIV-1-gp41 aus 22 Aminosäuren und enthält ungewöhnlicherweise die negativ geladene Aminosäure Arginin, die in allen HIV-1-Stämmen hochkonserviert ist (Hunter und Swanstrom, 1990). An dieser Stelle ist es erwähnenswert,

daß die Arbeitsgruppe um N. Dimmock postuliert, daß HIV-1-Env nicht über einen, sondern über drei Transmembrananker verfügt. In diesem allgemein hin nicht akzeptierten Modell durchqueren die 22 Aminosäuren der Env-TMD zweimal die Membran, wobei der besagte Argininrest am Wendepunkt der Aminosäurekette an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran liegt. Den dritten Membrananker soll ein Bereich darstellen, der in der LLP-2-Domäne (siehe unten) lokalisiert ist. Gründe, die für dieses Modell sprechen, sind zum einen die ungewöhnlich lange Env-TMD und die Präsenz des negativ geladenen Arginins inmitten der Env-TMD. Vor allem aber die Beschreibung eines neutralisierenden Antikörpers, der gegen ein Epitop in Env-CT (As-Position 739-743) gerichtet ist, spricht für eine mögliche Existenz des Env-Proteins mit drei Transmembranankern (Cleveland *et al.*, 2003).

In der C-terminalen Hälfte des Env-CTs existieren drei sogenannte *lentiviral lytic peptide*-Regionen, kurz LLP1-3 genannt (Miller *et al.*, Kliger und Shai, 1997; Chen *et al.*, 2001). Über diese Regionen, die α -helikales hydrophobisches Potential besitzen (Andreassen *et al.*, 1990), ist der Env-CT mit der zellulären Plasmamembran assoziiert (Haffar *et al.*, 1991). Synthetische Peptide, welche diese Motive repräsentieren, binden an Membranen und destabilisieren und permeabilisieren diese *in vitro* (Srinivas *et al.*, 1992; Chernomordik *et al.*, 1994; Kliger und Shai, 1997). LLP-3 besitzt außerdem die Eigenschaften eines Leucin-Zipper-Motivs (Kliger und Shai, 1997).

Der Env-CT enthält mehrere potentielle Endozytose-Signale. Zwei von ihnen, in Abb. 1.4 durch gelbe Balken dargestellt, basieren auf einem Tyrosin-abhängigen Motiv (YXX Φ), wobei das membrannähere Signal hochkonserviert ist und effizient die Endozytose von HIV-1-Env vermittelt (Rowell *et al.*, 1995) sowie an den zellulären Clathrin-assoziierten Adapter-Komplex AP-2 bindet (Ohno *et al.*, 1995; Ohno *et al.*, 1997). Mutagenese dieses ersten Tyrosin-anhängigen Endozytose-Signals resultiert in einer erhöhten Zelloberflächen-expression von HIV-1-Env (Berlioz-Torrent *et al.*, 1997; West *et al.*, 2002). Mutagenese des zweiten potentiellen Tyrosin-abhängigen Endozytose-Signals lieferte keine Hinweise auf eine vorhandene Funktionalität (Boge *et al.*, 1998). Weiterhin enthält der Env-CT fünf potentielle Dileucin-abhängige Endozytose-Motive, in Abb. 1.4 durch gelbe Dreiecke gekennzeichnet, von denen nur das am C-terminalen Ende von Env-CT lokalisierte Motiv als funktionell aktiv gezeigt wurde. Außerdem interagiert dieses am distalen Ende von Env-CT gelegene Dileucin-Motiv mit dem Adapter-Komplex AP-1 (Wyss *et al.*, 2001).

Die Präsenz des Env-CTs ist in polarisierten Zellen für basolaterale Virionenfreisetzung verantwortlich (Gabuzda *et al.*, 1992; Lodge *et al.*, 1994), wobei das membrannahe hochkonservierte Tyrosin, welches eben schon im Kontext der Endozytosesignale erwähnt wurde, essentiell ist (Lodge *et al.*, 1997).

Ein ebenso in allen HIV-1-Stämmen konserviertes Motiv des Env-CT ist eine palmitoyliertes Cystein, welches für die mögliche Lokalisierung von HIV-Env in *lipid raft*-Mikrodomänen der Zellmembran verantwortlich ist (Rousso *et al.*, 2000).

Es wurde mehrfach gezeigt, daß der Env-CT mit dem HIV-1-Matrix-Protein interagiert. Zum einen existieren Arbeiten, die dies anhand von Mutagenese-Analysen auf genetischer Ebene zeigen, wobei postuliert wurde, daß der Bereich der Interaktion in der LLP-2-Domäne liegt (Freed und Martin, 1996; Murakami und Freed, 2000b). Zum anderen wurde in Koimmunpräzipitationsanalysen mit GST-Env-Fusionsproteinen eine Interaktion von Env-CT und Matrix gezeigt, wobei hier der Bereich der Interaktion innerhalb der letzten 67 Aminosäuren von Env-CT lokalisiert wurde (Cosson, 1996).

Die Interaktion von Env-CT mit Matrix ist in mehrerer Hinsicht von funktioneller Bedeutung. Viele veröffentlichte Daten liefern eine Reihe von Hinweisen, daß Env-Glykoproteine über ihre direkte Interaktion mit Matrix in Virionen eingebaut werden. So unterbinden bestimmte Mutationen in Matrix den Einbau von HIV-1-Env in Virionen (Yu *et al.*, 1992; Freed und Martin, 1995; Freed und Martin, 1996). Dieser Glykoprotein-Einbaufekt kann durch Trunkation des HIV-1-Env-CTs oder durch Pseudotypisierung mit heterologen Env-Glykoproteinen mit kurzen CTs aufgehoben werden (Mammano *et al.*, 1995; Freed und Martin, 1995; Freed und Martin, 1996). Dies bedeutet, daß Env wohl in einigen Fällen ohne die Interaktion mit Matrix in Virionen eingebaut werden kann, daß aber der Einbau eines Env-Proteins voller Länge die spezifische Interaktion mit Matrix benötigt. Weiterhin wird postuliert, daß Matrix im Kontext des ungespaltenen Gag-Proteins mit dem Env-CT interagiert (Wyma *et al.*, 2000) und so den fusogenen Zustand von Env reguliert (Murakami *et al.*, 2004; Wyma *et al.*, 2004).

Mehrere zelluläre Interaktionspartner des Env-CTs wurden identifiziert, wobei die Bedeutung dieser jeweiligen Interaktionen nicht geklärt ist. Es wurde gezeigt, daß der Env-CT sowie synthetische Peptide, welche LLP-1 und LLP-2 repräsentieren, mit Calmodulin interagieren, und daß diese Interaktion in einer Störung wichtiger Calmodulin-vermittelter Prozesse resultiert (Srinivas *et al.*, 1993; Beary *et al.*, 1998). Die Assoziation mit Calmodulin wird auch mit Env-vermittelter Apoptose-Induktion in Verbindung gebracht (Ishikawa *et al.*, 1998; Micoli *et al.*, 2000).

Weiterhin wurde in *yeast two hybrid*-Analysen gezeigt, daß Env-CT über das Leucin-Zipper-Motiv der LLP-3-Region mit dem Aktin-assoziierten Adhäsionsprotein α -Catenin (Kim *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2002) sowie mit dem Guanotin-Nukleotid-Austausch-Faktor p115-RhoGEF (Zhang *et al.*, 1999) interagiert. p115-RhoGEF ist ein Aktivator der RhoA GTPase, die unter anderem an der Regulation des Aktinzytoskeletts und der Aktivierung des SRFs (*serum response factor*) beteiligt ist. In Zellen, die den Env-CT koexprimierten, wurden die Bildung

von Aktinkabeln, sogenannten *stress fibres*, sowie die Aktivierung des SRFs unterbunden, und Mutationen in Env-CT, welche den Verlust der Interaktion mit p115-Rho-GEF zur Folge hatten, führten zu einer inhibierten Virusreplikation in T-Zellen (Zhang *et al.*, 1999).

Eine Interaktion mit dem prenylierten Rab-Akzeptor (PRA), der beim zellulären Vesikeltransport eine Rolle spielt, wurde in *yeast two hybrid*-Analysen für den SIV-Env-CT nachgewiesen (Evans *et al.*, 2002).

1.5.2.2 HIV-1-Mutanten mit Trunkationen in Env-CT

HIV-1-Virusmutanten mit trunkierten Env-CTs wurden bereits eingehend analysiert (Wilk *et al.*, 1992; Dubay *et al.*, 1992; Gabuzda *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1993). In diesen Arbeiten wurde gezeigt, daß der Env-CT generell nicht für die proteolytische Prozessierung, die Stabilität, den Transport an die Zelloberfläche und für die Fusogenität von Env benötigt wird. Auch der Einbau der trunkierten Env-Proteine in Viruspartikel war in den meisten Fällen nicht defekt, wobei man erwähnen muß, daß diese Einbauanalysen mit Viruspartikeln stattfanden, die aus *in vivo* irrelevanten Zellen, z.B. COS- oder HeLa-Zellen, freigesetzt wurden.

Trotz all dieser intakten Eigenschaften waren die meisten HIV-1-Mutanten mit Trunkationen in Env-CT in den meisten infizierbaren T-Zellen replikationsinkompetent oder replizierten nur sehr langsam. Eine häufig analysierte Mutante ist ein HIV-1-Derivat, das in MT-4-Zellen im Vergleich zu Wt-HIV-1 nur leicht verzögert replizieren konnte, obwohl es für einen Env-CT von nur sieben Aminosäuren kodiert (pNL-Tr712) (Wilk *et al.*, 1992; Dubay *et al.*, 1992). Im Kontext dieser Mutante wurde mehrfach gezeigt, daß der Env-CT nicht für die Vermittlung von Infektiosität oder Replikationskompetenz in bestimmten Zellen benötigt wird. So konnte das in erheblichem Ausmaß trunkierte Env-Protein defekten HIV-1-Virionen, welche aufgrund spezifischer Mutationen in Matrix im Kontext von Wt-Env einen Env-Einbaufekt aufwiesen (siehe 1.5.2.1), durch Aufhebung des Einbaufekts Infektiosität und Replikationskompetenz verleihen (Freed und Martin, 1995; Mammano *et al.*, 1995; Freed und Martin, 1996). Weiterhin konnten MuLV-Vektorpartikel mit Env-Tr712 pseudotypisiert werden (was nicht mit Wt-Env möglich war), die dann entsprechende CD4-positive Zielzellen infizieren konnten (Schnierle *et al.*, 1997; Mammano *et al.*, 1997).

Eine zentrale Beobachtung innerhalb dieser Analysen war, daß die Replikationskompetenz dieser HIV-1-Mutante (und auch anderer mutanter HIV-1-Virionen mit trunkierten Env-CTs) stark von der jeweiligen Zielzelllinie abhing, in der die Replikation beobachtet wurde: Viren mit trunkierten Env-CTs konnten nur in wenigen, sogenannten permissiven Zelllinien wie MT-4- oder C8166-Zellen replizieren, während sie in den meisten T-Zell-Linien wie z.B. H9-

Zellen keine Infektion etablieren konnten, die daher als nicht-permissive Zellen bezeichnet werden (Dubay *et al.*, 1992; Freed und Martin, 1996; Murakami und Freed, 2000). Es war daher seitdem von besonderem Interesse, die Gründe für diesen Zelltyp-abhängigen Phänotyp von HIV-1-Mutanten mit trunkierten Env-CTs zu untersuchen.

Akari *et al.* (2000) und Murakami und Freed (2000a) zeigen Daten, die darauf hinweisen, daß der Zelltyp-abhängige Phänotyp auf einem Einbaufekt von trunkierten Env-Proteinen in HIV-1-Virionen basiert, welche aus nicht-permissiven Zellen freigesetzt werden. Damit hätte der Env-CT in nicht-permissiven Zellen die Aufgabe, den Einbau von Env in Virionen zu gewährleisten. Dennoch ist nicht geklärt, ob sich dieses Modell generell auf alle Virusmutanten mit Mutationen in Env-CT ausdehnen lässt, da auch HIV-1-Mutanten beschrieben wurden, die zwar signifikante Mengen mutierter Env-Proteine in Viruspartikeln, welche aus nicht-permissiven Zellen stammten, aufwiesen, aber dennoch eine verringerte Infektiosität zeigten (Piller *et al.*, 2000).

1.6 Zielsetzung

Der ungewöhnlich lange offene Leserahmen des HIV-1-Env-CTs ist *in vivo* streng konserviert, und HIV-1-Mutanten, die für trunkierte Glykoproteine kodieren, weisen *in vitro* hinsichtlich ihrer Replikationskompetenz einen Zelltyp-abhängigen defekten Phänotyp auf. Obwohl mehrere Eigenschaften des Env-CTs bekannt sind, ist es letztendlich nicht klar, was seine Präsenz für eine erfolgreiche HIV-1-Replikation *in vivo* und in sogenannten nicht-permissiven Zellen unabkömmlich macht. Das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, einen Beitrag zur Aufklärung der Rolle des Env-CTs in der HIV-1-Infektion und -Replikation zu leisten.

Hierfür wurden verschiedene in Env-CT trunkierte und in Env-TMD mutierte HIV-1-Derivate analysiert. Neben den Auswirkungen der jeweiligen Mutationen auf die Eigenschaften der Env-Glykoproteine hinsichtlich ihres Einbaus in Virionen und ihrer Fusionskapazität sollte der Phänotyp der HIV-1-Mutanten in diversen Infektiositäts-Analysen untersucht werden. Hierbei sollte eine klare Abgrenzung zwischen dem Phänotyp der Infektiosität zellfreier mutanter Virionen, die von nicht-permissiven Zellen freigesetzt wurden, und dem Phänotyp der Virusausbreitung in nicht-permissiven Zellen stattfinden. Weitere Untersuchungen betrafen mögliche Ursachen für die Permissivität bzw. Nicht-Permissivität von Zelllinien und die Fragestellung, ob ein nicht-permissiver Phänotyp durch das Einbringen gewisser Transgene aufgehoben werden kann.

Einen zweiten zentralen Aspekt der Arbeit stellte die Analyse von Varianten der HIV-1-Mutanten dar, die anhand von *second site*-Mutationen den ursprünglichen Zelltyp-abhängigen defekten Phänotyp kompensieren können. Hierbei wurde insbesondere die Variante pNL-Tr752(N750K) untersucht, die, wie sich im Verlauf der Analysen herausstellte, durch das Auftreten eines einzigen Aminosäure-Austauschs den Zelltyp-abhängigen Replikationsblock der ursprünglichen Virusmutante pNL-Tr752 überwinden und sich trotz eines trunkierten Env-CTs in nicht permissiven Zellen ausbreiten konnte. Diese Variante stellte somit ein optimales weiteres Werkzeug dar, um den Zelltyp-abhängigen Defekt der hier analysierten HIV-1-Mutanten noch besser untersuchen zu können.

2. MATERIAL

2.1 Antikörper

Die Verdünnungen der Antikörper in den Nachweisverfahren Immunfluoreszenz (IF), Western Blot (WB) oder FACS sind angegeben.

2.1.1 Primärantikörper

hu-α-HIV-1 (IF 1:100)	gepooltes humanes HIV-Patienten-Serum, erhalten von U. Wieland, Universität Köln.
Mab183 (IF und WB unverdünnt)	Muriner monoklonaler Antikörper gegen HIV-1-p24, Hybridomüberstand, bezogen über das <i>NIH AIDS Research and Reference Reagent Program</i> . Chesebro <i>et al.</i> , 1992.
rb-α-gp120 (WB 1:2500)	Polyklonales Kaninchen-Serum gegen HIV-1-gp120. Bosch und Pawlita, 1990.
Chessie 8 (WB unverdünnt)	Muriner monoklonaler Antikörper gegen HIV-1-gp160, Epitop ist in der C-terminalen Domäne von gp41 lokalisiert, Hybridomüberstand, bezogen über das <i>NIH AIDS Research and Reference Reagent Program</i> . Abacioglu <i>et al.</i> , 1994.
mo-α-EGFR	Muriner monoklonaler Antikörper gegen ein extrazelluläres Epitop des humanen EGFR, Hybridomüberstand. Waterfield <i>et al.</i> , 1982.
SIM.2/SIM.4	Murine monoklonale Antikörper gegen humanes CD4, Hybridomüberstände, bezogen über das <i>NIH AIDS Research and Reference Reagent Program</i> . McCallus <i>et al.</i> , 1992; Oravecz und Norcross, 1993.
mo-α-CD4 (FACS 1:100, Einbauversuche 5 μ g/ml)	Muriner monoklonaler Antikörper gegen humanes CD4, bezogen von <i>BD PharMingen</i> (San Diego, USA).

mo-α-Ezrin (WB 1:1000)	Muriner monoklonaler Antikörper gegen humanes Ezrin, erhalten von E. Turunen, Universität Helsinki, Finnland.
KC57-FITC (FACS 1:100)	FITC-gekoppelter muriner monoklonaler Antikörper gegen HIV-1-p24, bezogen von <i>Coulter</i> (Hialeah, USA).
12G5 (FACS 1:100)	Muriner monoklonaler Antikörper humanes CXCR4, bezogen über das <i>NIH AIDS Research and Reference Reagent Program</i> . Endres <i>et al.</i> , 1996.
mo-α-ICAM-1 (FACS 1:100)	Muriner monoklonaler Antikörper gegen humanes ICAM-1, erhalten von T. Schulz, Universität Hannover.
mo-α-LFA-1 (FACS 1:100)	Muriner monoklonaler Antikörper gegen humanes LFA-1, bezogen von <i>BD PharMingen</i> (San Diego, USA). Dustin und Springer, 1988.
mo-α-HPS-FITC (FACS 1:50)	FITC-gekoppelter muriner monoklonaler Antikörper gegen humanes Heparansulfat, bezogen von <i>Seikagaku</i> (Tokio, Japan). David <i>et al.</i> , 1992.

2.1.2 Sekundärantikörper

gt- α -hu FITC (IF 1:50), *Dianova* (Hamburg)
gt- α -mo ALEXA⁵⁹⁴ (IF 1:200), *Molecular Probes* (Eugene, USA)
gt- α -mo ALEXA⁴⁸⁸ (IF 1:200), *Molecular Probes* (Eugene, USA)
gt- α -mo POX (WB 1:100000), *Dianova* (Hamburg)
gt- α -rb POX (WB 1:100000), *Dianova* (Hamburg)
gt- α -mo PE (FACS 1:100), *Dianova* (Hamburg)

2.2 Bakterien

***E. coli* HB101**

Genotyp: F⁻, *hsd* S20 (r_B⁻m_B⁻), *thi*-1, *sup*E44, *ara*14, *gal*K2, *lac*Y1, *pro*A2, *rps*L20, (Str^R), *xyl*-5, *mtl*-1, *rec*A13, *mcr*B, *leu*B6

Invitrogen (Groningen, Niederlande)

2.3 Eukaryotische Zelllinien

2.3.1 Adhärenente Zellen

293T Humane embryonale Nierenepithelzelllinie, Zellen exprimieren stabil das SV40-T-Antigen. Pear *et al.*, 1993.

TZM-bl Humane HeLa-Derivate, die stabil CD4, CXCR4 und CCR5 exprimieren und stabile Integrate des β -Galaktosidase- und des Luziferase-Gens unter der Kontrolle des HIV-LTRs besitzen. Platt *et al.*, 1998; Derdeyn *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2002.

2.3.2 Suspensionszellen

C8166 Humane HTLV-1-transformierte T-Zell-Linie, die von Nabelschnur-Lymphozyten abgeleitet ist. Salahuddin *et al.*, 1983.

MT-4 Humane HTLV-1-transformierte T-Zell-Linie, die von einem Patienten mit T-Zell-Leukämie isoliert wurde. Harada *et al.*, 1985; Pauwels *et al.*, 1987 ; Larder *et al.*, 1989.

1G5 Von Jurkat-Zellen abgeleitete humane T-Zell-Linie, die stabil mit einem unter Kontrolle des HIV-LTRs stehenden Luziferase-Gen transfiziert ist. Aguilar-Cordova *et al.*, 1994.

H9 Von Hut78-Zellen (humane T-Zell-Lymphom-Zellen) abgeleitete T-Zell-Linie, die aufgrund hoher Permissivität für HIV-1-Wachstum selektiert wurde. Popovic *et al.*, 1984a; Mann *et al.*, 1989.

- H9-G** H9-Zellen, die stabil mit dem Vektor pWPI (siehe 2.5.1) transduziert sind. Wurden im FACS auf hohe GFP-Expression sortiert, nahezu 100% positiv für GFP-Expression. Im Verlauf der Arbeit generiert.
- H9-GT** H9-Zellen, die stabil mit dem Vektor pWPI-Tax (siehe 2.5.1) transduziert sind. Wurden im FACS auf hohe GFP-Expression sortiert, 83% positiv für GFP-Expression, Tax-Expression nicht bestätigt. Im Verlauf der Arbeit generiert.
- H9-TMD-CT** H9-Zellen, die stabil mit dem Vektor pWPI-Env-TMD-CT (siehe 2.5.1) transduziert sind. Wurden im FACS auf hohe GFP-Expression sortiert. Expression von Env-TMD-CT, einer membrangebundenen Form des HIV-1-Env-CT, bestätigt. Diplomarbeit W. Hildebrandt, Universität Heidelberg, 2004.
- PBMC** Aus peripherem Blut gewonnene PBMCs (Ficoll-Hypaque-Gradient) wurden von S. Fas, DKFZ Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

2.4 Enzyme

Die in der Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen *NEBiolabs* (Schwalbach) und *MBI Fermentas* (St. Leon-Roth) bezogen. Weitere verwendete Enzyme sind im folgenden aufgelistet:

Alkalische Phosphatase (CIP), 1 U/ μ l	<i>MBI Fermentas</i> (St. Leon-Roth)
T4-DNA-Polymerase, 1U/ μ l	<i>MBI Fermentas</i> (St. Leon-Roth)
T4-DNA-Ligase, 1 U/ μ l	<i>MBI Fermentas</i> (St. Leon-Roth)
RNase A, 2 mg/ml	<i>Roche</i> (Mannheim)
Herculase TM Hotstart Polymerase	<i>Stratagene</i> (La Jolla, USA)

2.5 Nukleinsäuren

2.5.1 Plasmide

Bezeichnung	Nr.	Quelle / Referenz	Beschreibung
p β Ak-env/neo	102	Kräusslich <i>et al.</i> , 1993	Expressionsplasmid für HIV-1-Env, Neomycinresistenz, β -Aktin-Promotor
pCMV Δ R8.91	545	Erhalten von R. Zufferey, Genf, Schweiz Zufferey <i>et al.</i> , 1997	Expressionsplasmid für subvirale HIV-1-Partikel (<i>gag</i> , <i>pol</i> , <i>rev</i> , <i>tat</i>), CMV-IE-Promotor
pMD.G	557	Erhalten von R. Zufferey, Genf, Schweiz Naldini <i>et al.</i> , 1996	Expressionsplasmid für VSV-G, CMV-IE-Promotor
pWPI	822	Erhalten von D. Trono, Genf, Schweiz	Bizistronischer HIV-1-Vektor, kodiert für IRES - GFP, ist SIN, enthält cPPT, WPRE, EF1 α -Promotor
pWPI-Tax	829	Erhalten von S. Fas, DKFZ Heidelberg	Derivat von pWPI, HTLV-1-Tax – IRES – GFP
pWPI-Env-TMD-CT	824	innerhalb der Arbeit kloniert	Derivat von pWPI, Env-TMD-CT – IRES – GFP

Plasmide, deren Expression im **L3/S3-Bereich** stattfindet:

Bezeichnung	Nr.	Quelle / Referenz	Beschreibung
pNL-Wt	27 (749)*	Bosch und Pawlita, 1990	Proviralet Wt-HIV-1-Klon (pNL4-3 ^{BH10}), Chimäre aus pNL4-3 und BH10
pNL-Tr712	94 (750)*	Wilk <i>et al.</i> , 1992	pNL-Wt-Derivat, kodiert für trunkiertes Env von 712 As Länge
pNL-Tr752	95 (751)*	Wilk <i>et al.</i> , 1992	pNL-Wt-Derivat, kodiert für trunkiertes Env von 752 As Länge
pNL-Tr813	96 (753)*	Wilk <i>et al.</i> , 1992	pNL-Wt-Derivat, kodiert für trunkiertes Env von 813 As Länge
pNL-TmR-I	151 (752)*	Wilk <i>et al.</i> , 1996	pNL-Wt-Derivat, besitzt einen As-Austausch in Env-TMD: R696I
pNL-TmCD22	265 (754)*	Wilk <i>et al.</i> , 1996	pNL-Wt-Derivat, Austausch der Env-TMD gegen CD22-TMD

Bezeichnung	Nr.	Quelle / Referenz	Beschreibung
pNL-Wt(N750K)	775 (776)*	innerhalb der Arbeit kloniert	pNL-Wt-Derivat, As-Austausch N750K
pNL-Tr752(N750K)	781 (782)*	innerhalb der Arbeit kloniert	pNL-Wt-Derivat, kodiert für trunkiertes Env von 752 As Länge, As-Austausch N750K
pNL-Tr813(N750K)	828	innerhalb der Arbeit kloniert	pNL-Wt-Derivat, kodiert für trunkiertes Env von 813 As Länge, As-Austausch N750K
pNL-ΔEnv	247	Henriksson und Bosch, 1998	Proviraer HIV-1-Klon, Leserahmenverschiebung in <i>env</i> führt nach 30 As zur Synthese eines defekten Env-Proteins

* die proviralen Plasmide liegen teilweise auch in einem Δvpr-Kontext vor (siehe 4.4.1), die entsprechenden Plasmidnummern der Δvpr-Konstrukte sind in Klammern angegeben.

2.5.2 Oligonukleotide

Alle im Rahmen dieser Arbeit benötigten Oligonukleotide wurden in der Abteilung „Oligonukleotidsynthese und DNA-Sequenzierung“ des DKFZ Heidelberg synthetisiert. Die Oligonukleotide und deren Sequenzen sind in 6.1 zu finden.

2.6 Kits

QIAGEN Plasmid Maxi Kit	<i>Qiagen</i> (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	<i>Qiagen</i> (Hilden)
QIAamp DNA Blood Mini Kit	<i>Qiagen</i> (Hilden)
Innotest™ HIV Antigen mAb	<i>Innogenetics</i> (Gent, Belgien)
Luciferase Assay System	<i>Promega</i> (Madison, USA)

2.7 Größenstandards

λ-DNA-Marker (<i>Hind</i> III-verdaut)	<i>MBI Fermentas</i> (St. Leon-Roth)
---	--------------------------------------

Low Range SDS-PAGE-Marker: *Bio-Rad* (Hercules, USA)

Protein	MG (kDa)
Phosphorylase B	113,0
Rinder-Serumalbumin	92,0
Ovalbumin	52,3
Carboanhydrase	35,3
Sojabohnen-Trypsininhibitor	28,7
Lysozym	21,3

2.8 Chemikalien und Reagenzien

An dieser Stelle wird darauf verzichtet, alle in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien und Reagenzien einzeln aufzulisten. Alle verwendeten Chemikalien werden unter dem Punkt *Puffer und Lösungen* (siehe 2.9) oder in den Kapiteln 3 oder 4 erwähnt und wurden üblicherweise von folgenden Firmen bezogen: *Merck* (Darmstadt), *Roth* (Karlsruhe), *AppliChem* (Darmstadt), *Fluka* (Buchs, Schweiz), *Sigma-Aldrich* (Steinheim) und *Gibco* (Karlsruhe). Einige Reagenzien und ihre Bezugsquellen sind im folgenden aufgelistet:

AMD3100	Erhalten von D. Schols und E. de Clercq, Universität Leuven, Belgien
AZT	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim)
DAPI	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim)
IL-2	erhalten von S. Fas, DKFZ Heidelberg
PHA	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim)
Polybren	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim)
Proteaseinhibitor Complete	<i>Roche</i> (Mannheim)
Saquinavir	<i>Roche</i> (Mannheim)
Streptavidin-Sepharose	<i>Amersham</i> (Uppsala, Schweden)
Sulfo-NHS-Biotin	<i>Pierce</i> (Rockford, USA)

2.9 Puffer und Lösungen

Agarosegelelektrophorese

50 x EP-Puffer :	2 M Tris/HCl, pH 7.5 250 mM Natriumacetat 50 mM EDTA mit Essigsäure auf pH 7.8 einstellen
EtBr-Lösung:	2 µg EtBr/ml
Farbmarker:	6 x loading dye, MBI Fermentas (St. Leon-Roth)

DNA-Minipräparation

Sol A:	50 mM Glukose 10 mM EDTA 25 mM Tris/HCl, pH 8.0
Sol B:	0,2 M NaOH 1% SDS
Sol C :	3 M Natriumacetat, pH 4.8

Kalzium-Phosphat-Transfektion

2 x HBS-Puffer:	50 mM HEPES, pH 7.2 280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ auf pH 7.13 einstellen steril filtrieren (Ø 0,2 µm)
CaCl ₂ -Lösung:	2,5 M

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Lösung A _{Kornberg} :	30% Acrylamid 0,15 % Bisacrylamid
Lösung A _{Laemmli} :	30% Acrylamid 0,8% Bisacrylamid
Lösung B:	1,5 M Tris/HCl, pH 8.8 0,4 % SDS
Lösung C:	0,75 M Tris/HCl, pH 6.8 0,4% SDS
2 x SB (sample buffer)	0,125 M Tris/HCl, pH 6.8 4% SDS 10% β-Mercaptoethanol 10% Glycerol 0,002% Bromphenolblau
5 x Laufpuffer (LP):	60 g Tris 285 g Glycin 10 g SDS ad 2000 ml VE-H ₂ O

X-Gal-Assay

Fixierlösung:	1% Formaldehyd 0,2% Glutaraldehyd in PBS
X-Gal-Lösung:	1 mg/ml X-Gal in DMSO 4 mM K ₃ Fe(CN) ₆ 4 mM K ₄ Fe(CN) ₆ 2 mM MgCl ₂

Diverse

EDTA	0,5 M pH auf 8.0 einstellen
Elvanol	20 g Moviol 4-88 80 ml PBS 20 ml Glycerol
TE	10 mM Tris/HCl, pH 8.0 1 mM EDTA
PBS	8 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ 0,25 g/l K ₂ HPO ₄ pH auf 7.4 einstellen
Boratpuffer	20 mM Borsäure 1 mM EDTA 0,1 mM DTT pH auf 8.8 einstellen

2.10 Bakterien- und Zellkulturmedien und -zusätze**2.10.1 Bakterienkultur**

Luria-Broth-Medium (LB)	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt 10 g/l NaCl pH auf 7.5 einstellen, autoklavieren
Ampicillin	Einsatz 100 µg/ml, <i>Roche</i> (Mannheim)

2.10.2 Zellkultur

DMEM und RPMI	<i>Gibco BRL</i> (Karlsruhe)
DMEM ^k und RPMI ^k	DMEM und RPMI <u>k</u> omplettiert mit FCS und PS (siehe unten)
Fötale Kälberserum (FCS)	Einsatz: 10%, <i>Gibco BRL</i> (Karlsruhe)
Penicillin-Streptomycin (PS)-Lösung	Einsatz 1%, <i>Gibco BRL</i> (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA (0,25% Trypsin)	<i>Gibco BRL</i> (Karlsruhe)
Einfriermedium	70% DMEM bzw. RPMI 20% FCS 10% DMSO

2.11 Geräte

Agarosegel-Kamera, *Biotec Fischer* (Heidelberg)
Brutschrank, *Forma Scientific* (Marietta, USA)
Easy Image Gel-Dokumentationssystem, *Herolab* (Wiesloch)
Eismaschine AF-3, *Scotsman* (Glasgow, England)
Agarosegel-Elektrophoresekammern, *Renner* (Darmstadt)
Entwicklermaschine Classic E.O.S., *Agfa* (Leverkusen)
FACS-Gerät (Durchflußzytometer), *Becton Dickinson* (Franklin Lakes, USA)
Feinwaage 2002MP1 *Sartorius* (Göttingen)
Filmkassetten X-OmatTM, *Kodak* (Stuttgart)
Fluoreszenz-Mikroskop, *Leitz* (Wetzlar)
Gefrierschrank, *Liebherr* (Heidelberg)
Kühl-Tischzentrifuge 5417.R, *Eppendorf* (Hamburg)
Magnetrührer, *Ika Labortechnik* (Staufen)
Mikroskop CKS, *Olympus* (Heidelberg)
Minifuge RF, *Heraeus* (Osterode)
Neubauer Zählkammer, *Neolab* (Heidelberg)
pH-Meter CG822, *Schott* (Mainz)
Pipettierhilfe (Pipetboy), *IBS Integra* (Fernwald)
Pipetten, *Gilson Abimed* (Langenfeld)
Rotoren GSA und F28/50, *Biotec Fischer* (Heidelberg)

Rotor SW41Ti, *Beckmann* (Palo Alto, USA)
Schüttler Rockomat, *Tecnomara* (Göttingen)
SDS-PAGE-Apparatur, *Bio-Rad* (Hercules, USA)
Spektralphotometer, *Hitachi* (Tokio, Japan)
Sterilbank, *Baker* (Stanford, USA)
Stromquelle, *Biotec Fischer* (Heidelberg)
Überkopfschüttler, *Heidolph* (Rust)
Ultrazentrifuge, *Beckmann* (Palo Alto, USA)
Vortex (Vibrationsmischer), *Bender und Hobein* (Zürich, Schweiz)
Western-Blot-Apparatur, *Bio-Rad* (Hercules, USA)
Zentrifuge RC5C, *Sorvall Du Pont* (Wilmington, USA)

2.12 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen, *Langenbrinck* (Emmendingen)
ECL-Filme Hyperfilm™, *Amersham* (Uppsala, Schweden)
Einweghandschuhe Gentle Skin™, *Meditrade* (Kiefersfelden)
Einwegpipetten, *Falcon* (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA)
Einwegpipettenspitzen, *Greiner* (Frickenhausen)
Einwegskalpelle, *PFM* (Köln)
Einwegspritzen, *Terumo* (Leuven, Belgien)
Immobilon-Membran, *Millipore* (Bedford, USA)
Eppendorfreaktionsgefäße, *Eppendorf* (Hamburg)
Multi-Loch-Zellkulturplatten, *Corning Inc.* (Corning, USA)
Kryoröhrchen, *Nalgene* (Rochester, USA)
Objektträger, *Langenbrinck* (Emmendingen)
PCR-Reaktionsgefäße, *Eppendorf* (Hamburg)
Sterifilter (Ø 0,2 µm und 0,45 µm), *Renner* (Dannstadt)
Ultrafiltrationsröhrchen (Vivaspin) 20 ml, *Vivascience* (Hannover)
Ultrazentrifugationsröhrchen, *Beckmann* (Palo Alto, USA)
Whatmann-Papier 3 MM, *Schleicher & Schuell* (Dassel)
Zellkulturflaschen, *Nunc* (Roskilde, Dänemark)
Zellkulturschalen, *Sarstedt* (Nümbrecht)
Zellsiebe (cell strainer), *Falcon* (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA)
Zentrifugationsröhrchen (PP und PS, 15 und 50 ml), *Greiner* (Frickenhausen)

3. METHODEN

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Lagerung und Kultur von Bakterien

Für die Transformation von Bakterien werden *Escherichia coli* (*E. coli*) vom Stamm HB101 verwendet. Die Anzucht der Kulturen erfolgt bei einer Temperatur von 37°C in Luria-Broth (LB)-Flüssigmedium (siehe 2.10.1) unter Schütteln bzw. auf LB-Agarplatten. Die Medien werden mit einer Selektionsdroge, im vorliegenden Falle mit Ampicillin (100µg/ml), versetzt, da alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide ein Resistenzgen (Amp^R) für Ampicillin tragen.

Flüssigkulturen werden mit einer geeigneten Menge an LB-Medium und der jeweiligen Selektionsdroge in einem entsprechend großen Gefäß angesetzt (z.B. in einem Erlenmeyerkolben, 80% des Gefäßvolumens sollten Luftraum sein). Das Animpfen des Nährmediums erfolgt mit einem sterilen Zahnstocher, mit dem eine geeignete Kolonie von einer Platte gepickt und dem Medium zugefügt wird.

Bei Plattenkulturen werden die Bakterien mit einer Impföse oder einem Drigalski-Spatel auf einer LB-Agarplatte, welche die geeignete Selektionsdroge enthält, ausgestrichen, so daß vereinzelte Kolonien erhalten werden.

Die Lagerung der Bakterien erfolgt bei 4°C bis zu zwei Wochen (Flüssigkultur) bzw. bis zu vier Wochen (Plattenkultur). Für eine längerfristige Lagerung werden von der Flüssigkultur Glycerolkulturen angelegt, die bei -80°C gelagert werden können. Dazu wird 1 ml einer Übernachtskultur mit 0,5 ml steril filtriertem Glycerin versehen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.1.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Um nackte DNA bzw. Plasmide aufnehmen zu können, müssen Bakterien durch ein bestimmtes Verfahren kompetent gemacht werden.

Dazu wird eine Flüssigkultur mit 5 ml LB/Amp-Medium mit einer Kolonie des gewünschten Bakterienstammes angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Diese Übernachtskultur wird zu 500 ml LB/Amp-Medium gegeben, worauf eine erneute Kultivierung bei 37°C unter ständigem Schütteln bis zu einer OD_{595nm} von 0,5 erfolgt (exponentielles Wachstum). Nach Abkühlung der Kultur in einem Eis-NaCl-Gemisch auf 4°C werden die

Bakterien in einem GSA-Rotor für 5 Minuten bei 8000 rpm und 0°C abzentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien werden anschliessend in 125 ml eiskaltem CaCl_2 (0,1 M) resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (Bedingungen siehe oben) wird das Bakterienpellet in einem Gemisch aus 21,5 ml CaCl_2 (0,1 M) und 3,5 ml 86%-igem Glycerin aufgenommen. Nicht direkt benötigte Zellen werden in 500 µl-Aliquots in Kryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

3.1.3 Transformation von *E. coli*

100 µl kompetente *E. coli* HB101 werden mit 100 ng Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C, bei dem die Plasmide von den Bakterien aufgenommen werden. Nach einer weiteren Inkubation des Transformationsansatzes für 2 Minuten auf Eis wird 1 ml LB-Medium ohne Ampicillin zugegeben, es folgt eine Inkubation im Wasserbad für 20 Minuten bei 37°C. Anschließend werden die Bakterien mit einer Tischzentrifuge bei 5000 rpm für 2 Minuten abzentrifugiert, der Überstand wird bis auf einen Rest von ca. 100 µl dekantiert, in welchem das Bakterienpellet resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen wird, die die entsprechende Selektionsdroge enthält. Die Platte wird über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Plasmid-DNA-Minipräparation

Puffer und Lösungen:

Sol A:	50 mM Glukose
	10 mM EDTA
	25 mM Tris/HCl, pH 8.0
Sol B:	0,2 M NaOH
	1% SDS
Sol C :	3 M Natriumacetat, pH 4.8

Die Plasmid-DNA-Minipräparation aus zuvor transformierten Bakterien (siehe 3.1.3) wird durchgeführt, um zu kontrollieren, ob die Transformation erfolgreich war, d.h. ob das gewünschte Plasmid von den Bakterien aufgenommen wurde. Für diesen rein analytischen Zweck reichen geringe Mengen an Plasmid-DNA. Werden dagegen größere Mengen an Plasmiden für experimentelle Zwecke benötigt, kommt die DNA-Maxipräparation zum Einsatz (siehe 3.2.2).

3 ml LB/Amp-Flüssigmedium werden mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. 1,5 ml der Übernachtskultur werden in ein Eppendorfröhrchen überführt und in einer Tischzentrifuge für 2 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert. Nach vollständigem Dekantieren des Überstandes werden die sedimentierten Bakterien in 100 µl Sol A resuspendiert und gevortext. Die Lyse der Bakterien erfolgt mit 200 µl Sol B nach vorsichtigem Mischen folgt eine Inkubationszeit von genau 5 Minuten auf Eis. Dann werden 150 µl Sol C zugegeben, und der Ansatz wird erneut für mindestens 5 Minuten auf Eis gehalten. Nach Zugabe von 500 µl Phenol/Chloroform-Gemisch (1:1) wird das Gemisch geschüttelt, aber nicht gevortext. Durch die anschließende Zentrifugation in einer Tischzentrifuge für 10 Minuten bei 13.000 rpm werden die wässrige und die organische Phase voneinander getrennt. Die nukleinsäurehaltige wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen, mit 1 ml eiskaltem 100%-igem Ethanol versetzt, gevortext und für mindestens 20 Minuten bei –20°C gelagert.

Nach Ethanolfällung der DNA (siehe 3.2.3.2) wird das getrocknete DNA-Sediment in 50 µl TE-Puffer aufgenommen, 2 µl davon werden für die Größenanalyse des Plasmides auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen (siehe 3.2.9).

3.2.2 Plasmid-DNA-Maxipräparation

Um größere Mengen eines Plasmides aus transformierten Bakterien für den experimentellen Einsatz zu erhalten (ca. 500 µg), impft man 200 ml LB/Amp-Flüssigmedium mit 2 ml einer Übernachtskultur an und inkubiert diese Großkultur über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler. Die anschließende Extraktion und Aufreinigung der Plasmid-DNA wird mit dem „QIAGEN Plasmid Maxi“-Kit der Firma *Qiagen* (Hilden) durchgeführt und verläuft nach dem Protokoll und mit den mitgelieferten Lösungen des Herstellers.

3.2.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren

3.2.3.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Mit einem Gemisch aus Phenol und Chloroform im Verhältnis 1:1 können Verunreinigungen durch Proteine oder Lipide aus DNA-Lösungen entfernt werden. Dazu wird der zu behandelnde Ansatz mit einem gleichem Volumen an Phenol/Chloroform versetzt, geschüttelt und anschließend für 10 Minuten bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Hierbei kommt es zu einer Phasentrennung der organischen und wässrigen Phase. Letztere enthält die Nukleinsäure und kann vorsichtig mit einer Pipette von der organischen Phase abgenommen werden. Zur Erhöhung der Nukleinsäure-Ausbeute kann die organische Phase mit der gleichen Menge TE-Puffer versetzt, geschüttelt und unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert werden, worauf anschließend die beiden wässrigen Phasen vereint werden. Die DNA kann dann aus der wässrigen Phase mit Ethanol gefällt werden (siehe 3.2.3.2).

3.2.3.2 Ethanolfällung

Die nukleinsäurehaltige Probe wird mit dem 3-fachen Volumen 100%-igem Ethanol und dem 0,1-fachen Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) versetzt und dann für mindestens 20 Minuten bei -20°C gefällt. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation des Ansatzes bei 0°C für 15 Minuten bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und die sedimentierte DNA mit 70%-igem kaltem Ethanol (-20°C) gewaschen. Nach Lufttrocknung des Sedimentes wird die Nukleinsäure in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer oder Wasser aufgenommen (meist 100-200 μl).

3.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt durch Messung ihrer optischen Dichte im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dazu wird eine geeignete Verdünnung der DNA-Lösung in H_2O hergestellt und 1 ml dieser Verdünnung im Photometer vermessen. Hierbei entspricht einer $\text{OD}_{260\text{nm}}$ von 1 eine Doppelstrang-DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ bzw. eine Einzelstrang-DNA-Konzentration von 33 $\mu\text{g/ml}$.

Proteinverunreinigungen von Nukleinsäure-Lösungen lassen sich durch den Quotienten aus $\text{OD}_{260\text{nm}}$ und $\text{OD}_{280\text{nm}}$ (aromatische Aminosäuren) bestimmen. Liegt dieser Wert zwischen 1,7

und 2,0, so gilt die DNA als ausreichend proteinfrei, ein Wert unter 1,7 ist ein Indiz für die Kontamination durch Proteine.

3.2.5 Restriktionsverdau von DNA

Zur sequenzspezifischen Spaltung von DNA-Molekülen in definierte Fragmente werden Restriktionsendonukleasen verwendet, die bestimmte Basensequenzen spezifisch erkennen und die DNA an dieser Stelle schneiden. Diese Enzyme gehören zum Abwehrdispositiv von Bakterien gegen fremde DNA, die durch feindliche Organismen, zum Beispiel durch Bakteriophagen, in sie eingedrungen ist. Die eigene DNA wird durch Methylierung von einzelnen Basen vor der Spaltung geschützt, gleichsam dient diese Modifikation auch zur Unterscheidung zwischen eigener und fremder Nukleinsäure. Durch einen Restriktionsschnitt können drei verschiedene Arten von Strangenden erzeugt werden: bei versetzten Schnitten entstehen 5'- oder 3'-Überhänge (*sticky ends*), bei geraden Schnitten entstehen stumpfe Enden (*blunt ends*).

Restriktionsenzyme werden zum einen bei Klonierungsarbeiten verwendet, um definierte Plasmid-Fragmente zu erhalten (präparativer Verdau), die anschließend durch Ligation (siehe 3.2.8.) zu neuen DNA-Molekülen verbunden werden, zum anderen finden sie Einsatz bei der Analyse von Plasmid-DNA (analytischer Verdau), da beim Verdau eines Stückes DNA durch definierte Restriktionsenzyme ein spezifisches Bandenmuster im Agarosegel entsteht. Verdauansätze setzen sich folgendermaßen zusammen:

Präparativer Verdau (100 µl Ansatz)	Analytischer Verdau (10 µl Ansatz)
10-20 µg DNA	1 µg DNA
50-100 U Enzym	5-10 U Enzym
10 µl 10 x geeigneter Enzympuffer	1 µl 10 x geeigneter Enzympuffer
ad 100 µl H ₂ O	ad 10 µl H ₂ O

Prinzipiell ist beim Ansetzen des Verdau zu berücksichtigen, daß Enzyme in 50%-igem Glycerin gelagert werden, optimale Reaktionsbedingungen aber eine Glycerinkonzentration von unter 5% erfordern. Daher darf der Anteil der Enzymlösung nicht mehr als 10% des

Gesamtansatzes betragen. Der Verdau erfolgt bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur für 1-2 Stunden.

3.2.6 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Um eine Religation des Vektors bei Klonierungen mit komplementären Enden zu verhindern, kann man das zuvor geschnittene Vektorplasmid an seinen 5'-Enden dephosphorylieren, damit die für die Ligation notwendige 5'-Phosphatgruppe fehlt. Dies geschieht mit Hilfe der Kälberdarmphosphatase CIP (*calf intestine alkaline phosphatase*), indem 1-5 µg des Vektors mit 1 U des Enzyms bei 37°C inkubiert werden. Nach 60 Minuten wird nochmals 1 U CIP für 30 Minuten zugegeben. Als Puffer können die NEB-Puffer 2, 3 und 4 der Firma *NEBiolabs* (Schwalbach) dienen.

3.2.7 Auffüllen von 5'-Überhängen

Um verschiedene DNA-Stücke in einem Plasmid miteinander kombinieren zu können, sollten im Idealfall in beiden Moleküle durch das gleiche Restriktionsenzym komplementäre *sticky ends* erzeugt werden. Dies ist jedoch nicht möglich, wenn in den erforderlichen Schnittbereichen die entsprechende Restriktionssequenz nicht vorhanden ist, so daß in beiden Molekülen verschiedene Restriktionsenzyme benutzt werden müssen, die nicht zueinander passende Enden erzeugen. Eine Lösung des Problems liegt darin, daß überhängende 5'-Enden mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Polymerase aufgefüllt werden können, so daß stumpfe Enden (*blunt ends*) entstehen, die sich sequenzunabhängig mit anderen stumpfen Enden ligieren lassen (siehe 3.2.8). Dafür werden 10 µg Plasmid-DNA mit 100 µM dNTPs (*Hybaid AGS*, Heidelberg) und 5 U der T4-DNA-Polymerase versehen und für 15 Minuten bei 15°C inkubiert. Anschließend wird das Enzym durch eine Inkubation des Ansatzes bei 75°C für 10 Minuten inaktiviert.

3.2.8 Ligation

Mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase können zwei DNA-Moleküle, z.B. Vektor und Insert, miteinander verknüpft werden. Hierbei katalysiert das Enzym die Bildung einer neuen Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe des einen und der 3'-OH-Gruppe

des anderen Fragmentes. Dazu werden 0,2 µg Vektor-DNA zu der 2-3-fachen molaren Menge an Insert-DNA gegeben. Als Kontrollansatz dient die Vektor-DNA alleine. Nach Zugabe von 1 µl 10 x T4-DNA-Ligase-Puffer, 1 U T4-DNA-Ligase und H₂O ad 10 µl wird der Ansatz über Nacht bei 15°C inkubiert.

3.2.9 Agarosegelelektrophorese

Puffer und Lösungen:

50 x Elektrophorese-Puffer (EP):	2 M Tris/HCl, pH 7.5 250 mM Natriumacetat 50 mM EDTA mit Essigsäure auf pH 7.8 einstellen
Ethidiumbromidlösung:	2 µg/ml
Farbmarker (6 x loading dye solution):	MBI Fermentas (St. Leon-Roth)

In einem Agarosegel lassen sich DNA-Fragmente elektrophoretisch auftrennen, wobei gleichzeitig ihre Größen im Vergleich zu einer bestimmten Marker-DNA bestimmt werden können. Je nach Auftrennungsbereich verwendet man verschiedenprozentige Agarosegele, wobei man kleine Fragmente mit einer hohen, größere Fragmente dagegen mit einer niedrigen Agarosekonzentration auftrennt. Im Rahmen dieser Arbeit werden 1%-ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wird im entsprechenden Volumen 1 x Elektrophoresepuffer bis zur Entstehung einer homogenen Lösung in der Mikrowelle aufgeköcht.

Für den Auftrag der Proben auf das Gel werden 0,1-1 µg DNA mit 2 µl 6x Farbmarker versetzt und der Ansatz mit H₂O auf 12 µl aufgefüllt. An das Gel wird eine Spannung von 10 V/Längenzentimeter angelegt. Nach Abschluß der elektrophoretischen Auftrennung wird das Gel für 10 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt und anschließend in Wasser für 10 Minuten entfärbt. Das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid kann mittels eines UV-Transluminators bei 254 nm sichtbar gemacht und gegebenenfalls fotografiert werden.

Bei präparativen Gelen wird der gesamte Verdauansatz mit 20 µl 6x Farbmarker auf ein Gel mit großen Taschen aufgetragen. Die Betrachtung und Präparation des Gels erfolgt zur Vermeidung von UV-Schäden an der zu präparierenden DNA bei einer Wellenlänge von 360 nm.

3.2.10 DNA-Elution aus Agarosegelen

Um die nach einer elektrophoretischer Auftrennung (siehe 3.2.9) erhaltenen DNA-Fragmente z.B. für eine Ligation weiterverwenden zu können, müssen diese aus dem Agarosegel herauspräpariert werden. Dazu wird das Gel bei langwelligem Licht von 360 nm betrachtet und das gewünschte Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution der DNA erfolgt mit dem „QIAquick Gel Extraction“-Kit der Firma *Qiagen* (Hilden) nach dem mitgelieferten Protokoll.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Elution werden 5 µl der erhaltenen DNA-Lösung auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 3.2.9).

3.2.11 Isolierung zellulärer genomischer DNA

Für die Isolierung zellulärer genomischer DNA aus infizierten Zellen wird das „QUIAamp DNA Blood Mini“-Kit der Firma *Qiagen* (Hilden) verwendet, die Durchführung erfolgt nach dem mitgelieferten Protokoll

3.2.12 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion oder kurz PCR (*polymerase chain reaction*) ist ein Verfahren zur Amplifikation definierter DNA-Bereiche. Im Rahmen der Arbeit wird diese Methode dazu verwendet, um einerseits provirale Fragmente genomischer DNA HIV-1-infizierter Zellen zu isolieren (im Verfahren der *nested* PCR, siehe 3.2.12.1), und um Punktmutationen in DNA-Sequenzen einzufügen bzw. DNA-Fragmente neu miteinander zu kombinieren (im Verfahren der Fusions-PCR, siehe 3.2.12.2).

Voraussetzung für die Polymerase-Kettenreaktion ist das Vorhandensein einer Matrizen-DNA, welche als Vorlage dient, und an der eine DNA-Polymerase einen komplementären Strang synthetisieren kann. Des weiteren werden zwei Oligonukleotide bzw. sogenannte *Primer* benötigt, die jeweils an einem Ende des zu amplifizierenden Bereiches mit dem (+)-Strang bzw. dem (-)-Strang hybridisieren und der Polymerase als Startpunkt für die Reaktion dienen können.

Die Reaktion läuft nach folgendem Prinzip ab: nach Hitze-Denaturierung der DNA lagern sich die *Primer* bei Abkühlung des Reaktionsansatzes an die jeweiligen Einzelstränge der DNA-Matrize an. Eine hitzestabile Polymerase erstellt ausgehend vom 3'-OH-Ende des jeweiligen

hybridisierten *Primers* einen dem Matrizen-Strang komplementären Strang. Nach erfolgter Synthese werden die neu entstandenen Doppelstränge erneut denaturiert, und die Prozedur wiederholt sich. Durch mehrfaches Wiederholen dieses Zyklus erreicht man so eine exponentiell verlaufende Amplifikation des gewünschten DNA-Bereiches.

In der Arbeit wird das Enzym *HerculaseTM Hotstart DNA Polymerase* der Firma *Stratagene* (La Jolla, USA) verwendet. Dieses Enzym besitzt eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität und somit eine Korrekturlesefähigkeit, was eine fehlerfreie Vervielfältigung der gewünschten DNA ermöglicht. Dies ist bei der Untersuchung unbekannter Sequenzen sowie bei Klonierungsvorgängen von wesentlicher Bedeutung. Der Begriff *Hotstart* bedeutet, daß das Enzym in einem durch Antikörper vermittelten inaktiven Zustand vorliegt, was ein unspezifisches Arbeiten der Polymerase und unerwünschte Exonukleaseaktivität vor Beginn der PCR verhindert. Im ersten Denaturierungsschritt, d.h. bei Erhitzen der Probe auf 95°C, kommt es zu einer irreversiblen Denaturierung der Antikörper, und das Enzym kann seine Funktion voll entfalten.

Ein typischer PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl setzt sich folgendermaßen zusammen (die einzelnen Komponenten des Ansatzes sollen in der gegebenen Reihenfolge pipettiert werden):

Komponente	Quantität pro Reaktion
Aqua dest.	X µl ad 50 µl
10 x Herculase-Reaktionspuffer	5,0 µl
dNTP-Mischung (2,5 mM jedes dNTPs)	4,0 µl
DNA-Matrize	1-15 ng (Plasmid-DNA, PCR-Fragmente) bzw. 100-250 ng (genomische DNA)
<i>Primer 1</i>	100 ng
<i>Primer 2</i>	100 ng
<i>HerculaseTM Hotstart DNA Polymerase</i>	0,5 µl

Nach dem Ansetzen der Proben werden diese vorsichtig gemischt, nochmals kurz in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, in PCR-Reaktionsröhrchen überführt und mit 50 µl Mineralöl (*Sigma-Aldrich*, Steinheim) überschichtet.

Anschließend erfolgt die Amplifikation der Proben nach folgendem Protokoll:

Segment	Zyklenanzahl	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	2 Minuten
2	10	95°C	30 Sekunden
		<i>Primer</i> $T_M - 5^\circ\text{C}$ *	30 Sekunden
		72°C	60 Sekunden pro kb der DNA- Matrize
3	20	95°C	30 Sekunden
		<i>Primer</i> $T_M - 5^\circ\text{C}$ *	30 Sekunden
		72°C	60 Sekunden pro kb der DNA- Matrize
			+10 Sekunden/Zyklus

* T_M bezeichnet den Schmelzpunkt der jeweiligen *Primer* und wird zur Berechnung der *Annealing*-Temperatur herangezogen. Haben die beiden *Primer* unterschiedliche Schmelzpunkte, wird üblicherweise die niedrigere der beiden Temperaturen für die Berechnung verwendet.

3.2.12.1 Nested PCR

Mit dem Verfahren der sogenannten *nested* (= verschachtelten) PCR kann man die Spezifität der Polymerase-Kettenreaktion beträchtlich erhöhen. Diese Methode wird im Rahmen der Arbeit bei der Amplifizierung proviraler Sequenzen aus der genomischen DNA infizierter T-Zellen verwendet.

Hierfür setzt man das PCR-Produkt einer ersten PCR-Reaktion in einer zweiten PCR-Reaktion ein, wobei das *Primer*-Paar dann zwischen den *Primern* der ersten Reaktion liegt. Dies führt dazu, daß unspezifische Reaktionsprodukte, die in der ersten PCR entstanden sein könnten, praktisch ausgeschlossen werden.

3.2.12.2 Fusions-PCR

Mit Hilfe der Fusions-PCR werden Punktmutationen in DNA-Sequenzen eingeführt, der schematische Ablauf dieser Methode ist in Abb. 3.1 dargestellt.

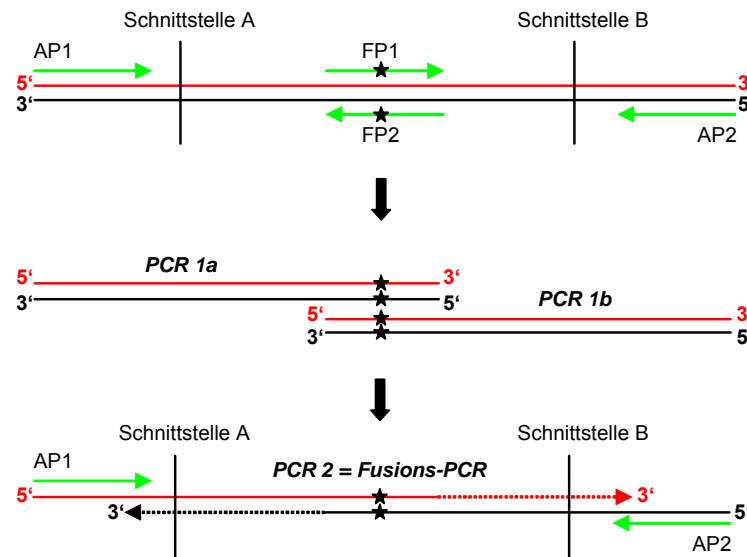


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Ablaufs der Fusions-PCR.

Detaillierte Erläuterungen im Text. AP = Außen-Primer, FP = Fusions-Primer, ★ = eingeführte Mutation

Für diese Methode werden zwei Arten von *Primern* benötigt: zum einen Fusions-*Primer* (FP), ein zueinander komplementäres Oligonukleotidpaar, welches die gewünschte Mutation trägt. Zum anderen müssen geeignete Außen-*Primer* (AP) gewählt werden, welche ober- bzw. unterhalb der später für die Klonierung gewünschten Restriktionsschnittstellen liegen. Es ist auch möglich, mittels der Sequenz der AP neue Restriktionsschnittstellen in den PCR-Produkten zu generieren.

Im ersten Schritt der Fusions-PCR werden zwei verschiedene Produkte an derselben DNA-Vorlage generiert: In Reaktion 1a kommen die *Primer* AP1 (Sinn) und FP2 (Gegensinn) bzw. in Reaktion 1b die *Primer* FP1 (Sinn) und AP2 (Gegensinn) zum Einsatz. Das Ergebnis dieser beiden ersten Reaktionen sind zwei DNA-Sequenzen, die an der Position der Fusions-*Primer* überlappen.

Diese beiden Fragmente werden dann nach Aufreinigung siehe (3.2.10) in der Fusions-PCR mit den beiden Außen-*Primern* eingesetzt. Nach Denaturierung der Stränge kommt es in der *Annealing*-Phase zur Hybridisierung der jeweils zueinander komplementären Bereiche aus den PCR-Reaktionen 1a und 1b, die beiden freien 3'-OH-Enden dienen dann der DNA-Polymerase als Startpunkt der DNA-Synthese. Am Hybridisierungsprodukt der beiden anderen zueinander komplementären Stränge kann dagegen keine DNA synthetisiert werden, da keine freien 3'-OH-Enden vorliegen.

Nach erfolgter Amplifikation wird das neu entstandene Produkt aufgereinigt (siehe 3.2.10) und kann, wenn gewünscht, nach Restriktionsverdau (siehe 3.2.5) für Klonierungen verwendet werden.

3.2.13 DNA-Sequenzierungen

Alle Sequenzierungen wurden in der Abteilung „Oligonukleotidsynthese und DNA-Sequenzierung“ des DKFZ Heidelberg durchgeführt.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Lagerung und Kultur eukaryotischer Zellen

Die Kultur der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien erfolgt im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM^k-Medium (adhärente Zellen) bzw. in RPMI^k-Medium (Suspensionszellen). Um ein Absterben der Zellen durch Kontaktinhibierung oder durch eine Unterversorgung zu vermeiden, werden die Zellen in regelmäßigen Abständen gesplittet.

Adhärente Zellen werden dafür vom Boden der Kulturschale gelöst, indem man sie mit Trypsin behandelt: nach Abnehmen des alten Mediums von der Platte gibt man 10 ml der Trypsin-Lösung zu den Zellen, schwenkt die Platte, so daß sich die Flüssigkeit gleichmäßig verteilt, und nimmt mit der Pipette alles bis auf ca. 1 ml der Lösung ab. Dann wird die Platte für ca. 3 Minuten bei 37°C gehalten, anschließend können die Zellen durch vorsichtiges Scheren mit der Pipette vom Boden gelöst, in einem geeigneten Volumen an frischem DMEM^k-Medium aufgenommen und je nach Bedarf auf neuen Platten verteilt werden. Suspensionszellen werden gesplittet, indem man einen Teil der Kultur abnimmt und diesen mit einem entsprechenden Volumen an frischem RPMI^k-Medium in eine neue Kulturflasche überführt.

Die dauerhafte Lagerung der Zellen erfolgt in flüssigem Stickstoff. Die gewünschte Menge an Zellen wird bei 1.200 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur in der Heraeus-Minifuge abzentrifugiert, in einem geeigneten Volumen an gekühltem Einfriermedium (siehe 2.10.2) aufgenommen und in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt. Damit die Zellen langsam abkühlen, werden die Röhrchen in Zellstoff verpackt und über Nacht bei -70°C gelagert, danach können sie dann für eine längerfristige Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Das Auftauen von Zellen aus flüssigem Stickstoff erfolgt zügig bei 37°C. Um das im Einfriermedium enthaltene für die Zellen toxische DMSO zu entfernen, wird der Inhalt des Röhrchens in 5 ml auf 37°C vorgewärmtes Medium überführt, und die Zellen werden bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 1.200 rpm in der Heraeus-Minifuge abzentrifugiert. Anschließend nimmt man die Zellen in einem geeigneten Volumen an frischem Medium auf.

Sämtliche Arbeiten, die im Zusammenhang mit der Kultur eukaryotischer Zellen stehen, werden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

3.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Mit Hilfe der Neubauer Zählkammer wird die Zellzahl einer Zellsuspension bestimmt. Die in der Kammer gezählte Zahl von Zellen muß mit dem Kammerfaktor 10^4 multipliziert werden, um die Menge von Zellen in 1 ml Zellsuspension zu erhalten.

3.3.3 Transiente Kalzium-Phosphat-Transfektion

Puffer und Lösungen:

2 x HBS-Puffer:	50 mM HEPES, pH 7.2 280 mM NaCl 1,5 mM Na_2HPO_4 pH 7.13 einstellen, steril filtrieren
CaCl_2 -Lösung	2,5 M

Das Verfahren nutzt die Tatsache aus, daß Plasmid-DNA mit Kalzium-Phosphat Präzipitate bildet, welche von adhärennten eukaryontischen Zellen sehr effektiv endozytotisch aufgenommen werden.

10 µg Plasmid-DNA werden ad 450 µl mit sterilem H_2O verdünnt und mit 50 µl 2,5 M CaCl_2 zu einem Endvolumen von 500 µl gemischt. Diese DNA-Lösung wird tropfenweise zu 500 µl 2 x HBS-Puffer gegeben, gut gemischt und für genau 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Inkubationszeit bilden sich die oben erwähnten Kalzium-Phosphat-Präzipitate, was an der langsamen Trübung des Gemisches zu erkennen ist. Nach der Inkubationszeit wird die Lösung tropfenweise zu den Zellen einer Platte (8,5 cm Ø) gegeben, welche dann für 4 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert wird. In dieser Zeit nehmen die Zellen die DNA-Kalzium-Phosphat-Aggregate auf. Nach diesen 4 Stunden werden die Zellen gewaschen, indem man das alte Medium abnimmt und frisches Medium zugibt. Die Ernte der transfizierten Zellen bzw. des Zellkulturüberstands erfolgt ca. 48-72 Stunden nach der Transfektion (p.T. = *post transfection*).

Für Transfektionen in eine Sechs-Loch-Platten-Vertiefung wird ein Drittel, für Transfektionen in größere Zellkultur-Platten (15 cm Ø) wird das Dreifache der oben beschriebenen Mengen eingesetzt.

Allgemein ist bei der Transfektion zu beachten, daß der Transfektionsansatz die Menge von einem Zehntel des Medienvolumens nicht überschreitet.

3.3.4 Aufreinigung von Viruspartikeln durch Ultrazentrifugation

Virushaltiger Zellkulturüberstand wird 48 Stunden nach Infektion von den Zellen abgenommen, filtriert (Ø 0,45 µm) und anschließend vorsichtig auf ein Saccharosekissen (2 ml 20%-ige Saccharose in PBS, steril filtriert) aufgetragen. Das Zentrifugenröhrchen wird dann mit Zellkulturmedium vollständig aufgefüllt. Die Ultrazentrifugation erfolgt bei 4°C in einem *swing-out*-Rotor (SW41Ti, *Beckmann*, Palo Alto, USA) für 3 Stunden bei 35.000 rpm unter Anlegen eines Vakuums. Der Überstand wird nach Beendigung des Zentrifugenlaufs vorsichtig mit einer 10 ml-Pipette vollständig abgenommen. Die Wände des Röhrchens werden mit Zellstoff gereinigt und das nicht sichtbare Viruspellet in 100 µl 1%-igem Triton X-100 in PBS lysiert (siehe 3.5.6).

3.3.5 Aufkonzentration von Viruspartikeln durch Ultrafiltration

Die Methode der Ultrafiltration dient zur schnellen Aufkonzentration von Viruspartikeln. Im Rahmen der Arbeit werden in 293T-Zellen produzierte Vektorpartikel über Säulen der Firma *Vivascience* (Hannover) aufkonzentriert. Die Säulen besitzen eine semipermeable Membran mit einem *MG-cutoff* von 100 kDa, die während eines Zentrifugationsschrittes im Medium gelöste hochmolekulare Substanzen auf Basis der Molekülgröße vom Lösungsmedium trennt. Die Partikelpräparationen sind daher im Gegensatz zur Aufkonzentration über Ultrazentrifugation relativ schmutzig, da auch im Transfektionsüberstand vorhandene Makromoleküle wie etwa BSA aufkonzentriert werden.

Je 20 ml des vektorpartikelhaltigen Transfektionsüberstands werden auf die Säulen geladen, die dann bei 3000 rpm (*Heraeus* Minifuge) zentrifugiert werden. Nach 15 Minuten hat ein Teil des geladenen Transfektionsüberstands die Membran passiert, und man kann nach Bedarf weitere Mengen des Transfektionsüberstands auf die Säulen laden und durch weitere Zentrifugationsschritte bis zum gewünschten Endvolumen aufkonzentrieren.

3.3.6 Semi-quantitative Zell-Zell-Fusion

Mit diesem Versuch werden im Rahmen der Arbeit die Fusionskapazitäten verschiedener mutierter Env-Glykoproteine untersucht. Dafür werden mit VSV-G-pseudotypisierten HIV-1-Virionen infizierte MT-4- oder H9-Zellen (siehe 3.4.2) 48 Stunden nach Infektion abzentrifugiert, in 1 ml frischem RPMI^k-Medium aufgenommen und für weitere 4 Stunden mit 1 ml konfluenten 1G5-Zellen kokultiviert.

1G5-Zellen sind Jurkat-Derivate, welche die HIV-1-Rezeptoren CD4 und CXCR4 exprimieren sowie ein stabil ins Genom integriertes Luziferase-Gen unter Kontrolle des HIV-LTRs besitzen. Da die HIV-1-infizierten T-Zellen Env auf ihrer Oberfläche exprimieren, sollte es – insofern das jeweils betrachtete Env-Protein fusogen ist – zu Zellfusionsvorgängen zwischen diesen beiden Zelltypen kommen. Nach Fusion kann das im Rahmen der HIV-Infektion in den T-Zellen exprimierte Tat-Protein den in 1G5-Zellen befindlichen LTR aktivieren, was zur Luziferase-Expression führt. Die Stärke der gemessenen Luziferase-Aktivität (siehe 3.5.9) dient dann als Maß für die Fusionskapazität der analysierten Env-Proteine.

Um auf Unterschiede in der viralen Genexpression der infizierten Zellen abzugleichen, werden die erhaltenen Meßwerte anhand der p24-Konzentrationen normalisiert, die jeweils im Kulturüberstand der infizierten Zellen im p24-ELISA gemessen wurden (siehe 3.5.7). Da den eigentlichen Infektionsansätze der HIV-1-Protease-Inhibitor Saquinavir (*Roche*, Mannheim) beigelegt ist, um die Bildung infektiöser Partikel zu unterbinden, wird jeweils ein paralleler Ansatz *ohne* Proteaseinhibitor mitgeführt. Dies ermöglicht die Messung der p24-Konzentration im Zellkulturüberstand, da die Reagenzien des hier verwendeten p24-ELISA-Kits p24 nicht im Kontext des ungespaltenen Pr55^{Gag}-Vorläufermoleküls erkennen.

3.4 Infektionen und Transduktionen

3.4.1 Replikation von HIV-1 in T-Zellen und PBMCs

Für die Produktion von Virionen werden 293T-Zellen mit 10 µg der entsprechenden proviralen DNA transient transfiziert (siehe 3.3.3). 48-72 Stunden danach erfolgt das Ernten der Transfektionsüberstände, die filtriert werden (Ø 0,45 µm) und deren p24-Konzentration im p24-ELISA (siehe 3.5.7) bestimmt wird. Die virushaltigen Zellkulturüberstände werden aliquotiert und bei -70°C gelagert.

Für Replikationsanalysen in C8166-, MT-4- oder H9-Zellen werden je 10⁶ Zellen in einem Gesamtvolumen von 1-2 ml RPMI^k-Medium mit gleichen Mengen an virushaltigem

Transfektionsüberstand infiziert, meist äquivalent zu 0,1 µg p24, und 5 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dann werden die Zellen dreimal in 10 ml RPMI^k-Medium gewaschen und nach dem letzten Waschschrift in 2 ml RPMI^k-Medium aufgenommen. Für das Erstellen von Replikationskinetiken werden ca. alle 2-3 Tage Proben des Kulturüberstandes genommen und im p24-ELISA vermessen, um so die Menge neu synthetisierter und in den Überstand freigesetzter Virionen zu bestimmen (siehe 3.5.7). Ein Teil der Zellen wird entnommen, abzentrifugiert, in PBS gewaschen und für Immunfluoreszenz-Analysen auf einem Objektträger aufgebracht (siehe 3.5.1). Die infizierte Zellkultur wird je nach Bedarf alle 3-4 Tage mit frischem RPMI^k-Medium gesplittet.

Bei Erstellen von Replikationskinetiken in PBMCs werden frische oder aufgetaute aufgereinigte Spenderzellen 2 Tage vor Infektion in RPMI^k-Medium aufgenommen, das zur Stimulation der T-Zellblasten 1 µg/ml Phytohämagglutinin (PHA) und 25 U/ml Interleukin-2 (IL-2) enthält. Die Infektion von 10⁶ PBMCs und das Erstellen der Replikationskinetiken erfolgt wie oben beschrieben, allerdings wird immer PHA- und IL-2-haltiges RPMI^k-Medium verwendet.

3.4.2 VSV-G-vermittelte Infektion von MT-4- und H9-Zellen

Für eine massive Infektion von MT-4 und H9-Zellen werden VSV-G-pseudotypisierte HIV-1-Virionen verwendet. VSV-G bindet an zelluläre Oberflächenlipide und vermittelt sehr effizient den endozytotischen Eintritt der adsorbierten Viruspartikel in Zellen. Für die Herstellung solcher VSV-G-pseudotypisierter Viruspartikel werden 293T-Zellen mit 10 µg der jeweiligen proviralen DNA sowie jeweils 1-3 µg eines VSV-G-Expressionsplamids (pMD.G) transient kotransfiziert (siehe 3.3.3). 48-72 Stunden nach Transfektion erfolgt das Ernten der virushaltigen Kulturüberstände, die filtriert werden (Ø 0,45 µm) und deren p24-Konzentration im p24-ELISA (siehe 3.5.7) bestimmt wird. Die Zellkulturüberstände werden aliquotiert und bei -70°C gelagert.

Für Glykoproteineinbau-Versuche werden jeweils 10 ml konfluente MT-4- bzw. H9-Zellen (ca. 3 x 10⁶ Zellen) abzentrifugiert und in etwa gleichen Volumina der virushaltigen 293T-Transfektionsüberstände resuspendiert. Üblicherweise werden Mengen verwendet, die zuvor im p24-ELISA (siehe 3.5.7) auf eine Gesamtkonzentration von etwa 5 bis 10 µg p24 normalisiert wurden. Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden in Anwesenheit von Polybren (8 µg/ml), was die Adhäsion der Viren an die Zellen verstärkt, werden die Zellen dreimal in je 10 ml RPMI^k-Medium gewaschen und in 10 ml frischem RPMI^k-Medium aufgenommen. Dem Medium wird dann entweder ein CD4-Antikörper (mo-α-CD4, 5 µg/ml) oder der CXCR4-

Antagonist AMD3100 (1 µg/ml) beigesetzt. Die Zugabe dieser Reagenzien, welche die Bindung von gp120 an CD4 bzw. CXCR4 blockieren, soll Env-vermittelte Membranfusion und Zytotoxizität unterbinden. Dies ist wichtig, da Zytotoxizität möglicherweise zur Freisetzung von Zelldebris und Membranvesikeln ins Medium führen könnte. Diese stellen potentielle Kontaminanten der Virionenpräparationen dar und würden eventuell die Ergebnisse verfälschen. Die Aufreinigung der freigesetzten Partikel erfolgt 48 Stunden nach Infektion per Ultrazentrifugation durch ein 20%-iges Saccharosekissen (siehe 3.3.4).

Für die semi-quantitative Zell-Zell-Fusion wird ein 1 ml-Aliquot der MT-4 bzw. H9-Zellen, die im Rahmen der Einbauversuche mit VSV-G-pseudotypisierten Virionen infiziert wurden (siehe oben), nach dem Waschen in 1 ml RPMI^k-Medium aufgenommen und in eine Vertiefung einer 12-Loch-Platte überführt. Die Inkubation dieses Ansatzes erfolgt in Anwesenheit des HIV-1-Protease-Inhibitors Saquinavir (*Roche*, Mannheim), was die Freisetzung infektiöser Partikel verhindern soll. 48 Stunden nach Infektion werden die infizierten MT-4- bzw. H9-Zellen dann im Zell-Zell-Fusions-Versuch eingesetzt (siehe 3.3.6).

Für Oberflächenbiotinylierungen infizierter MT-4-oder H9-Zellen werden 10 ml konfluente MT-4- bzw. H9-Zellen (ca. 3×10^6 Zellen) abzentrifugiert und wie oben beschrieben mit VSV-G-pseudotypisierten Virionen infiziert. Die Inkubation nach dem Waschen erfolgt bei 37°C ohne die Zugabe weiterer Reagenzien. 48 Stunden nach Infektion erfolgt die Oberflächenbiotinylierung der infizierten Zellen (siehe 3.5.10).

3.4.3 VSV-G-vermittelte Transduktion von H9-Zellen

Für die Produktion von Vektorpartikeln werden 293T-Zellen in drei großen Transfektionsansätzen (15cm-Zellkulturschalen) jeweils mit folgenden drei Plasmiden transient transfiziert (siehe 3.3.3): 30 µg Vektor-DNA, 19,5 µg pCMVΔ8.91 (Verpackungskonstrukt) und 9 µg pMD.G (Expressionsplasmid für VSV-G). Nach dem Waschen der Transfektionsansätze werden die 293T-Zellen zum Zweck der erhöhten Konzentrierung der Vektorpartikel nur mit 20 ml statt mit 30 ml DMEM^k-Medium überschichtet. 72 Stunden nach Transfektion erfolgt die Aufkonzentration der in den Transfektionsüberstand abgegebenen Vektorpartikel durch Ultrafiltration (siehe 3.3.5). Generell können 60 ml Transfektionsüberstand zu einem Volumen von etwa 2-3 ml aufkonzentriert werden. Die vektorhaltige aufkonzentrierte Suspension wird entweder direkt verwendet oder aliquotiert und bei -70°C gelagert.

Für die Transduktion werden 500 µl der aufkonzentrierten Vektorpartikel-Suspension zu 1 ml subkonfluenten H9-Zellen in Anwesenheit von Polybren (8 µg/ml) gegeben. Die Zellen

werden nach 5-stündiger Inkubation bei 37°C in RPMI^k-Medium gewaschen, in 1,5 ml frischem RPMI^k-Medium aufgenommen und expandiert. Bei Bedarf werden die transduzierten Zellen nochmals mit den restlichen bei –70°C gelagerten Vektorpartikeln transduziert, um so eine höhere Transduktionseffizienz zu erreichen.

3.4.4 Quantifizierung der Infektiosität aus MT-4- oder H9-Zellen stammender zellfreier Virionen (*single rounds of infection*)

Um Virionen aus MT-4- bzw. H9-Zellen zu gewinnen, werden MT-4 und H9-Zellen wie in 3.4.2 beschrieben mit in 293T-Zellen produzierten VSV-G-pseudotypisierten HIV-1-Virionen infiziert, 5 Stunden nach Infektion ausgiebig gewaschen und in 10 ml RPMI^k-Medium aufgenommen. 72 Stunden nach Infektion erfolgt die Ernte der virushaltigen Überstände, die gefiltert (\varnothing 0,45 μ m) und nach Bestimmung der p24-Konzentration (p24-ELISA, siehe 3.5.7) in folgenden Infektionsexperimenten eingesetzt werden.

3.4.4.1 Infektiosität zellfreier Virionen in TZM-bl-Zellen

TZM-bl-Zellen sind HeLa-Derivate, welche die HIV-1-Rezeptoren CD4, CXCR4 und CCR5 exprimieren und stabil integrierte Luziferase- und β -Galaktosidase-Gene unter der Kontrolle des HIV-LTRs besitzen. Bei einer Infektion durch HIV-1-Virionen werden diese Reportergene durch die Aktivität des viralen Tat-Proteins exprimiert, wobei die Stärke der Expression ein Maß für die Effizienz der jeweiligen Infektion ist.

TZM-bl-Zellen werden einen Tag vor Ansetzen des Infektionsexperiments in einer 12-Loch-Platte (Messung der Luziferase-Expression) bzw. einer 96-Loch-Platte (Messung der β -Galaktosidase-Expression) so ausplattiert, daß sich am Tag des Experiments ca. 10^6 Zellen in einer 12-Loch-Platten-Vertiefung bzw. 5×10^4 Zellen in einer 96-Loch-Platten-Vertiefung befinden. Die Infektion mit auf 0,2 μ g p24 abgeglichenen virushaltigen MT-4- bzw. H9-Kulturüberständen (p24-ELISA, siehe 3.5.7) erfolgt entweder durch direkte Zugabe zu TZM-bl-Zellen in der 12-Loch-Platte bzw. durch Erstellen von 1:4-Verdünnungsreihen, die dann zu den TZM-bl-Zellen in der 96-Loch-Platte gegeben werden. 24 Stunden nach Infektion erfolgt die Quantifizierung der β -Galaktosidase- (siehe 3.5.8) und der Luziferase-Expression (siehe 3.5.9).

3.4.4.2 Infektiosität zellfreier Virionen in T-Zellen

Alternativ wird die Infektiosität aus MT-4- oder H9-Zellen stammender zellfreier Virionen in MT-4- bzw. H9-Zellen gemessen. Hierfür werden 5×10^6 MT-4- bzw. H9-Zellen abzentrifugiert und in normalisierten Mengen an virushaltigem Zellkulturüberstand resuspendiert, der wie eingangs beschrieben von mit VSV-G-pseudotypisierten Virionen infizierten MT-4- und H9-Zellen gewonnen wurde. Üblicherweise entspricht die für die jeweiligen Infektionen benutzte Menge an MT-4- oder H9-Virionen etwa $1 \mu\text{g p24 pro } 10^6$ Zellen. Die Zellen werden 5 Stunden nach Infektion ausgiebig je dreimal in $10 \text{ ml RPMI}^{\text{K}}$ -Medium gewaschen anschließend in $0,5 - 2 \text{ ml RPMI}^{\text{K}}$ -Medium aufgenommen.

24 Stunden nach Infektion wird zum einen die de novo-Virionenfreisetzung von MT-4- und H9-Zellen gemessen. Dies erfolgt durch Konzentrationsbestimmung von p24 im Kulturüberstand (p24-ELISA, siehe 3.5.7).

Außerdem wird die de novo-Synthese von Gag in MT-4- und H9-Zellen 24 Stunden nach Infektion gemessen. Dazu werden die infizierten Zellen abzentrifugiert und nach intrazellulärer Gag-Färbung im FACS-Gerät analysiert (siehe 3.5.2).

Einen Kontrollansatz stellt die Präsenz von AZT ($50 \mu\text{M}$) in den Infektionsansätzen dar. AZT ist ein Nukleosidanalogon und inhibiert die Reverse Transkriptase, so daß es zu keiner produktiven Infektion der Zellen kommt. Dieser Ansatz liefert einen Hintergrundwert für die unspezifische Assoziation von Virionen mit MT-4- bzw. H9-Zellen.

Als Kontrollansatz für unspezifische Env-unabhängige Assoziation von Virionen mit den zu infizierenden Zellen werden in einem Infektionsansatz Virionen verwendet, die kein Env-Protein exprimieren und daher keine Infektion initiieren können (pNL- ΔEnv , siehe 2.5.1).

3.5 Proteinanalyse

3.5.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz von Zellen dient der Kontrolle der Proteinexpression in Zellen, z.B. um HIV-1-Infektionsverläufe in infizierten T-Zellen zu verfolgen oder Transduktions- und Transfektionseffizienzen zu ermitteln.

Zur Durchführung dieser Versuche verwendet man bei adhärenenten Zellen Deckgläschen, die auf den Boden der Kulturschale gelegt werden und somit mit Zellen bewachsen sind. Bei Suspensionszellen wird zunächst ein Aliquot der Zellsuspension abzentrifugiert, das Medium

abdekantiert und das Zellpellet im verbleibenden Medium resuspendiert. Diese Suspension streicht man kreisförmig auf einen Objektträger auf und läßt sie an der Luft trocknen.

Für die Analyse werden die Deckgläschen bzw. Objektträger zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen bei -20°C für mindestens 20 Minuten in einem Gemisch aus Methanol und Aceton [1:1] inkubiert und anschließend an der Luft getrocknet. Die Deckgläschen bzw. Objektträger werden dann in eine feuchte Kammer überführt und für 30 Minuten bei 37°C mit 50 μl 1%-iger BSA-Primärantikörperlösung oder in 50 μl unverdünntem Hybridomüberstand inkubiert. Nach 10-minütigem Waschen in PBS werden 50 μl der 1%-igen BSA-Sekundärantikörperlösung, der DAPI zugesetzt wird (1 $\mu\text{g/ml}$), auf die Zellen gegeben. Darauf folgt eine weitere Inkubation bei 37°C für 30 Minuten. Anschließend wird der überschüssige Zweitantikörper durch 10-minütiges Waschen in PBS entfernt. Die Deckgläschen bzw. Objektträger werden je einmal kurz in H_2O und anschließend in 100%-iges Ethanol getaucht, an der Luft getrocknet und anschließend in Elvanol (siehe 2.9) eingebettet.

Die Betrachtung der Zellen erfolgt unter dem Fluoreszenzmikroskop bei der für das jeweilige verwendete Fluorochrom geeigneten Wellenlänge.

3.5.2 FACS (*fluorescence activated cell sorting*)

Mit der FACS-Analyse wird die Oberflächenexpression bestimmter Proteine von Zellen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern analysiert, weiterhin wird diese Methode auch verwendet, um intrazelluläre GFP- oder Gag-Expression nachzuweisen. In dieser Arbeit werden ausschließlich Suspensionszellen (T-Zellen) in der FACS-Analyse verwendet. Für eine optimale Durchführung des Färbeprotokolls werden ca. $3-5 \times 10^6$ Zellen benötigt. Je nachdem, wie viele Waschschriffe durchgeführt werden, welche immer zu einem Verlust von Zellen führen, ist es sinnvoll, das Färbeprotokoll mit einer möglichst hohen Ausgangsmenge an Zellen zu beginnen.

Die Zellen werden im Medium resuspendiert und abzentrifugiert (4°C , 1.200 rpm, 10 Minuten, Heraeus Minifuge) und unter Überführung der Probe in eine Eppendorf-Reaktionsgefäß einmal mit PBS gewaschen (4°C , 5000 rpm, 2 Minuten). Das Zellpellet wird dann wie folgt beschrieben weiterbehandelt.

Oberflächenfärbung:

Die Zellen werden für 20 Minuten in 500 μl 3% PFA in PBS fixiert und danach einmal mit FACS-Puffer (3% FCS in PBS) gewaschen. Das Zellpellet wird in 100 μl

Primärantikörperlösung aufgenommen (Primärantikörper verdünnt in FACS-Puffer) und für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer erfolgen die Inkubation in 100 µl Sekundärantikörperlösung (Fluorophor-gekoppelte Sekundärantikörper verdünnt in FACS-Puffer) für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß, erneutes zweimaliges Waschen in FACS-Puffer und die Aufnahme der Zellen in 500 µl FACS-Puffer zur Vermessung.

Nachweis der GFP-Expression:

Hierfür werden die Zellen nicht fixiert, die benötigte Menge an Zellen wird wie oben beschrieben herunterzentrifugiert, einmal in PBS gewaschen und für die Messung der GFP-Expression in 500 µl PBS aufgenommen.

Intrazelluläre p24-Färbung:

HIV-1-infizierte T-Zellen (siehe 3.4.4.2) werden nach einmaligem Waschen in PBS zunächst für 3 Stunden in 3% PFA in PBS fixiert, um Zell-assoziierte infektiöse Virionen zu inaktivieren. Anschließend werden die Zellen erneut einmal mit PBS gewaschen und das Zellpellet in 100 µl Primärantikörperlösung aufgenommen (Primärantikörper KC57-FITC 1:100 verdünnt in 0,1% Triton X-100 / 3% FCS in PBS), gefolgt von einer 20- bis 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß. Nach dreimaligem Waschen in PBS werden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer (3% FCS in PBS) aufgenommen.

Die Proben werden dann nach Vereinzelung der Zellen durch ein Zellsieb (*cell strainer*) im FACS-Gerät vermessen.

3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Puffer und Lösungen:

Lösung A _{Kornberg} :	30% Acrylamid 0,15 % Bisacrylamid
Lösung A _{Laemmli} :	30% Acrylamid 0,8% Bisacrylamid
Lösung B:	1,5 M Tris/HCl, pH 8.8 0,4 % SDS

Lösung C:	0,75 M Tris/HCl, pH 6.8 0,4% SDS
2 x SB (<i>sample buffer</i>)	0,125 M Tris/HCl, pH 6.8 4% SDS 10% β -Mercaptoethanol 10% Glycerol 0,002% Bromphenolblau
5 x Laufpuffer	60 g Tris 285 g Glycin 10 g SDS ad 2000 ml VE-H ₂ O

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist ein Standardtrennverfahren für Proteine. Der verwendete Probenauftragspuffer (2 x SB) enthält β -Mercaptoethanol, welches in der Lage ist, Disulfidbrücken zu zerstören. Das Detergenz SDS denaturiert die Proteine und gleichzeitig überlagert die Ladung der Sulfatreste die Eigenladung der Aminosäuren. Somit besitzen denaturierte Proteine eine gleiche Ladungsverteilung; die Ladung der Proteine ist daher zu ihrer Größe direkt proportional.

Bei dem hier verwendeten Gelsystem handelt es sich um ein diskontinuierliches System, welches aus einem Sammelgel und 15%-igen Trenngel besteht. Die Gele setzen sich wie folgt zusammen:

Kornberg / Laemmli-Gel 15%

Sammelgel:

Lösung A _{Laemmli}	567,0 μ l
Lösung C	1,1 ml
H ₂ O	2,7 ml
10 % APS	44,0 μ l
TEMED	4,4 μ l

Trenngel:

Lösung A _{Kornberg}	2,2 ml
Lösung B	1,1 ml
H ₂ O	1,1 ml
10 % APS	60 μ l
TEMED	3 μ l

Die Proteinproben werden mit dem entsprechenden Volumen an 2 x SB-Puffer versehen, für 10 Minuten im Wasserbad aufgekocht, kurz abzentrifugiert und dann auf das Gel aufgetragen. Als Referenz werden 5 µl *low range*-Marker der Firma *Bio-Rad Laboratories* (Hercules, USA), versetzt mit 15 µl 2 x SB-Puffer, verwendet. Der Gellauf erfolgt in einer vertikalen, mit 1 x Laufpuffer gefüllten Gelkammer bei 1 V/cm².

3.5.4 Western Blot und ECL (*enhanced chemoluminescence*)

Lösungen und Materialien:

Boratpuffer	20 mM Borsäure 1 mM EDTA 0,1 mM DTT pH 8.8
Lösung 1 (Blockierlösung):	10% BSA, 10% Tween-20 in PBS
Lösung 2 (Waschlösung):	1% BSA, 1% Tween-20 in PBS
Primärantikörperlösung:	Primärantikörper verdünnt in Lösung 2
Sekundärantikörperlösung:	Sekundärantikörper verdünnt in Lösung 2
ECL-Lösung:	<i>Amersham</i> (Uppsala, Schweden)
Immobilon-Membran:	<i>Millipore</i> (Bedford, USA)
Methanol	

Proteine, die durch die SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, werden durch die Western-Blot-Methode auf eine Immobilon-Membran transferiert. Auf dieser Membran können dann anschließend die gewünschten Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert werden. In dieser Arbeit wird das Naßblot-Tanksystem der Firma *Bio-Rad* (Hercules, USA) verwendet.

Nach Beendigung des Gellaufes wird das Trenngel vom Sammelgel getrennt und kurz in Wasser und Boratpuffer geschwenkt. Anschließend erfolgt folgendermaßen der Zusammenbau der Naßblot-Apparatur:

Anode	
<hr/>	
Schwamm	
2 x Whatman-Papier	
Membran, 5 sek. in Methanol, dann kurz in VE-Wasser und Boratpuffer geschwenkt	
Gel	
2 x Whatman-Papier	
Schwamm	
<hr/>	
Kathode	

Der Transfer erfolgt bei 60 Volt (maximal 350 mA) für 90 Minuten in Boratpuffer. Nach Beendigung des Blots wird die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur in der Blockierlösung inkubiert, bevor dann die Primärantikörperlösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C zugegeben wird. Nach dreimaligem Waschen für je 10 Minuten in der Waschlösung wird die Membran für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Sekundärantikörperlösung inkubiert und anschließend erneut dreimal für je 10 Minuten in der Waschlösung gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird die Membran für 1 Minute in der ECL-Lösung geschwenkt und einem ECL-Film exponiert.

3.5.5 Strippen von gefärbten Western Blot-Membranen

An eine Western Blot-Membran gebundene Antikörper können mit dieser Methode durch Denaturierung entfernt werden. Dadurch ist eine erneute Detektion anderer gebundener Proteine mit weiteren spezifischen Antikörpern möglich. Die Membran wird hierfür unter Schwenken für 5 bis 10 Minuten in 0,2 M NaOH inkubiert, kurz mit Waschlösung (siehe 3.5.4) gewaschen und kann dann, beginnend mit der Inkubation in Blockierlösung, erneut gefärbt werden (siehe 3.5.4).

3.5.6 Herstellung von Zell- und Viruslysaten (1% Triton X-100)

Nach Entfernen des Mediums und einmaligem Waschen in PBS werden die zu lysierenden Zellen in Lysepuffer aufgenommen (1% Triton X-100 in PBS, versetzt mit 1 x Proteaseinhibitor) und bei 4°C für 10 Minuten bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge

zentrifugiert. Der Überstand, welcher die zytoplasmatischen Proteine als auch Membranbestandteile enthält, wird vom kernhaltigen Pellet abgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Lysate durch Ultrazentrifugation (UZ) aufgereinigter Viruspartikel (siehe 3.3.4) werden gewonnen, indem 50 µl Lysepuffer (siehe oben) nach Abnahme des Überstandes direkt auf den Boden des UZ-Röhrchens pipettiert werden. Nach vorsichtigem mehrmaligem Auf- und Abpipettieren werden diese 50 µl in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, gefolgt von nochmaliger Zugabe von 50 µl Lysepuffer auf den Boden des UZ-Röhrchens, erneutem mehrmaligem Auf- und Abpipettieren und Überführung des Lysats in das Eppendorfreaktionsgefäß.

Zell- und Viruslysate werden bei –20°C gelagert.

3.5.7 p24-ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)

Zum Nachweis von p24, dem HIV-1-Kapsidprotein, kommt der ELISA-Kit *Innotest™ HIV Antigen mAb* der Firma *Innogenetics* (Gent, Belgien) zum Einsatz. Die Durchführung erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers, die Auswertung erfolgt an einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm.

3.5.8 Nachweis zellulärer β-Galaktosidase-Expression (X-Gal-Assay)

Puffer und Lösungen:

Fixierlösung: 1% Formaldehyd
 0,2% Glutaraldehyd
 in PBS

X-Gal-Lösung: 1 mg/ml X-Gal in DMSO
 4 mM K₃Fe(CN)₆
 4 mM K₄Fe(CN)₆
 2 mM MgCl₂

Zellen, welche das Gen *lacZ* für β-Galaktosidase besitzen und dieses Enzym exprimieren, können mit diesem Nachweisverfahren blau angefärbt werden. Im Rahmen der Arbeit werden HIV-1-infizierte TZM-bl-Zellen mit diesem Nachweisverfahren angefärbt, um die

Konzentration infektiöser Einheiten (IU, *infectious units*) in virionenhaltigem Zellkulturüberstand zu bestimmen (siehe 3.4.4.1).

Dafür werden die in einer 96-Loch-Platte gewachsenen TZM-bl-Zellen einmal mit PBS gewaschen, durch Zugabe von 100 µl der Fixierlösung für 5 Minuten fixiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe der X-Gal-Lösung erfolgt die Blaufärbung der Zellen bei 37°C für bis zu 24 Stunden. Die Zählung der X-Gal-gefärbten Zellen erfolgt unter dem Durchlichtmikroskop.

3.5.9 Nachweis zellulärer Luziferase-Expression

Der Nachweis zellulärer LTR-induzierten Luziferaseexpression wird mit den Reagenzien des *Luciferase Assay System-Kits* der Firma *Promega* (Madison, USA) nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt. In der Arbeit werden zum einen 1G5-Zellen im Rahmen des semi-quantitativen Zell-Zell-Fusions-Versuchs (siehe 3.3.6) und zum anderen TZM-bl-Zellen im Rahmen der Messung der Infektiosität zellfreier Virionen (siehe 3.4.4.1) auf Luziferaseexpression hin untersucht. Die zu untersuchenden Zellen werden in 100 µl Lysepuffer lysiert und für 5 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. 10 µl des daraus resultierenden Überstands werden dann mit 50 µl der Luziferin-haltigen Reporterlösung im Luminometer vermessen.

3.5.10 Biotinylierung zellulärer Oberflächen-Proteine

Puffer und Lösungen:

Biotinylierungslösung:	1 mg/ml Sulpho-NHS-Biotin (<i>Pierce</i> , Rockford, USA)
Biotinquench-Puffer:	0,2% BSA
	0,1 M Glyzin
	in PBS

Biotin ist ein natürlich vorkommendes Molekül, das eine hohe Affinität für die Bindung an das Protein Streptavidin aufweist. Da es sehr klein ist (244 Da), kann es mit Proteinen konjugiert werden, ohne deren biologische Aktivität zu beeinträchtigen. Biotinylierte Protein können dann in biochemischen Nachweisverfahren mit Streptavidin-gekoppelten Sonden detektiert werden.

Bei dem hier verwendeten Sulpho-NHS-Biotin handelt es sich um eine NHS (*N*-Hydroxysuccinimid)-aktivierte Form von Biotin, die effizient unter der Ausbildung stabiler Amidbindungen mit primären Aminogruppen von Proteinen reagiert. Durch die negative Ladung der Sulfatgruppe kann Sulpho-NHS-Biotin keine Zellmembranen durchqueren, was das Molekül geeignet macht für die Biotinylierung von zellulären Oberflächenproteinen.

Bei der Versuchsdurchführung ist es wichtig darauf zu achten, daß alle Schritte auf Eis durchgeführt werden. Mit VSV-G-pseudotypisierten Virionen infizierte MT-4- und H9-Zellen (siehe 3.4.2) werden 48 Stunden nach Infektion abzentrifugiert und einmal mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen, gefolgt von 30-minütiger Inkubation in 1 ml der Biotinylierungslösung. Nach Waschen der Zellen in 10 ml eiskaltem PBS werden überschüssige Sulpho-NHS-Biotin-Moleküle durch Zugabe von 1 ml Biotinquench-Puffer blockiert. Nach erneutem Waschen der Zellen in 10 ml eiskaltem PBS erfolgt die Lyse der Zellen in 1% Triton X-100 in PBS (siehe 3.5.6).

Die Lysate werden auf die im Kulturüberstand der infizierten Zellen gemessenen p24-Konzentrationen normalisiert (p24-ELISA, siehe 3.5.7) und jeweils mit 50 µl Streptavidin-gekoppelter Sepharose (*Amersham*, Uppsala, Schweden) und 1 ml 1% Triton X-100 für 4 Stunden bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 1 ml 1 % Triton X-100 in PBS werden die Sepharose-Kügelchen in 20 µl 2 x SB-Puffer (siehe 2.9) aufgenommen, 10 Minuten gekocht und bei 13.000 rpm für 30 sek. abzentrifugiert. Der hieraus resultierende Überstand wird nach SDS-PAGE (siehe 3.5.3) im Western Blot analysiert (siehe 3.5.4).

4. ERGEBNISSE

4.1 HIV-1-Expressionsplasmide

Um die Rolle des C-Terminus (Env-CT) bzw. der transmembranalen Domäne (Env-TMD) von HIV-1-Env zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere HIV-1-Virusmutanten mit Modifikationen im Env-Protein analysiert. Hierfür wurden provirale HIV-1-Expressionsplasmide verwendet, welche Derivate des HIV-1-Klons pNL4-3^{BH10} (Bosch und Pawlita, 1990) sind. pNL4-3^{BH10}, im folgenden pNL-Wt genannt, ist eine infektiöse Chimäre der beiden molekularen HIV-1-Klone pNL4-3 (Adachi *et al.*, 1986) und BH10 (Ratner *et al.*, 1987), und wurde durch Austausch des *SalI/BamHI*-Fragments von pNL4-3 gegen das entsprechende Fragment aus BH10 erzeugt. Abb. 4.1 zeigt die schematische Genomstruktur von pNL-Wt und die Position der eben erwähnten Schnittstellen.

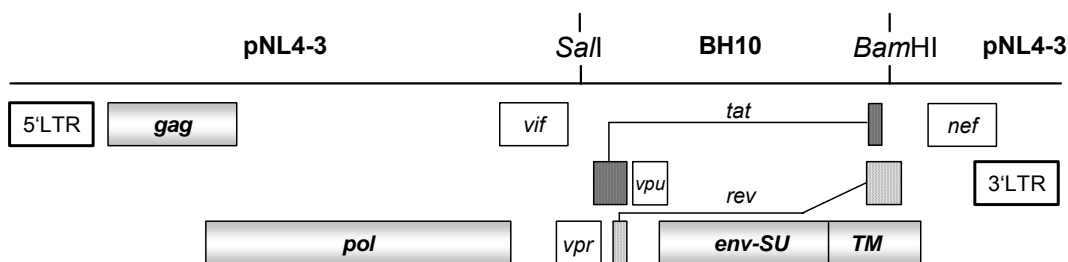


Abb. 4.1: Schematische Genomstruktur von pNL-Wt.

Gekennzeichnet ist, welche Sequenzen von pNL-Wt von pNL4-3 bzw. BH10 stammen. Weiterhin sind die Restriktionsschnittstellen *SalI* und *BamHI* markiert, welche das von BH10 abgeleitete und in pNL4-3 inserierte Fragment flankieren.

Bei den zu untersuchenden Virusmutanten handelt es sich nun zum einen um pNL-Derivate, welche frühzeitige *in frame*-Stopkodons in *env* besitzen, die zu einer Expression von verkürzten Env-Proteinen führen. Hierbei wurde jeweils eine Mutante mit einer langen, einer mittellangen und einer kurzen Deletion in Env-CT gewählt, nämlich pNL-Tr712, pNL-Tr752 und pNL-Tr813 (Wilk *et al.*, 1992). In pNL-Tr752 wird der überlappende Leserahmen von *rev* durch die Einführung der verschiedenen Stopkodons nicht geändert.

Zum anderen handelt es sich um pNL-Derivate, welche Mutationen in Env-TMD tragen. pNL-TmR-I besitzt einen Aminosäure-Austausch im Membran-Anker. Hier wurde ein in allen HIV-1-Stämmen hochkonserviertes Arginin (Hunter und Swanstrom, 1990) durch Isoleucin

ersetzt. In pNL-TmCD22 ist der gesamte transmembranale Bereich durch die TMD von CD22 ausgetauscht (Wilk *et al.*, 1996). CD22 ist ein B-Zell-Antigen, es wurde für den Austausch der Transmembran-Region gewählt, da das Protein eine ähnliche Struktur wie HIV-1-Env aufweist (Typ-I-Membranprotein): es besitzt eine stark glykosylierte extrazelluläre Region, einen einzigen Membrananker mit einer Länge von 19 Aminosäuren (Membrananker von HIV-1-Env: 22 Aminosäuren) sowie einen langen zytoplasmatischen C-Terminus von 118 Aminosäuren.

Keine der eben beschriebenen eingeführten Mutationen in Env-CT oder Env-TMD beeinträchtigt bekannte *cis*-regulatorische Sequenzen. Alle mutierten Env-Proteine sind in Abb. 4.2 im Vergleich zu Env-Wt dargestellt.

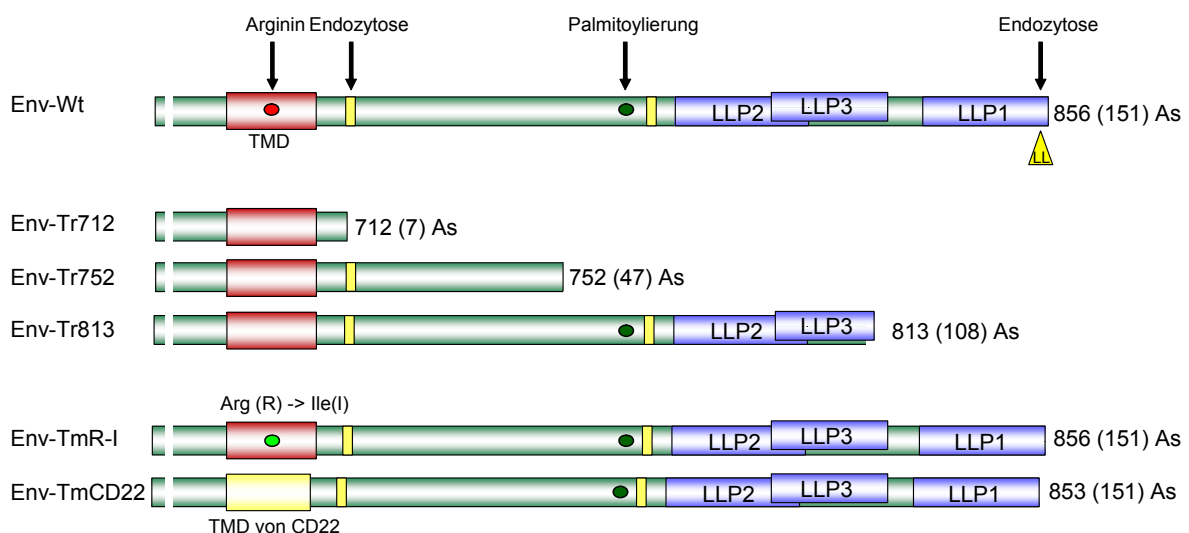


Abb. 4.2: Übersicht der verschiedenen mutierten HIV-1-Env-Glykoproteine.

Die Abbildung stellt die verschiedenen mutierten Env-Proteine im Vergleich zu Env-Wt schematisch dar. Abgebildet ist jeweils die gp41-Untereinheit von Env, wobei die extrazelluläre Domäne verkürzt dargestellt ist. Am Ende der Proteine ist jeweils die Länge der Polypeptidkette des gesamten Env-Proteins angegeben und in Klammern dahinter die Anzahl der zytoplasmatischen Aminosäuren. Detaillierte Informationen zu den hier dargestellten Motiven und Bereichen sind in 1.5.2.1 zu finden. As = Aminosäuren, LLP = *lentiviral lytic peptide*, TMD = Transmembrandomäne.

Vor Beginn der Experimente wurden die mutierten Bereiche der vorhandenen proviralen Plasmide sequenziert, um die Existenz der entsprechenden Mutationen zu bestätigen und das Auftreten ungewollter Mutationen ausschließen zu können. Hierbei wurden im Falle des bis dato verwendeten pNL-TmR-I-Konstrukts zwei zusätzliche Punktmutationen detektiert, weswegen diese Mutante ausgehend von pNL-Wt mittels Fusions-PCR neu generiert wurde. Die dafür verwendeten Oligonukleotide und die Mutagenese-Strategie sind unter 6.2.1 zu finden.

4.2 Zelltyp-abhängige Replikation der HIV-1-Mutanten

HIV-1-Mutanten mit Trunkationen des Env-CTs verschiedener Länge wurden in der Literatur schon eingehend beschrieben (Gabuzda *et al.*, 1992; Wilk *et al.*, Dubay *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1993; Murakami und Freed, 2000a; Akari *et al.*, 2000). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß diese Mutanten in den meisten infizierbaren T-Zell-Linien wie z.B. H9-Zellen nicht replizieren können. Diese Zellen werden daher als *nicht-permissiv* für diese Mutanten bezeichnet. Nur in wenigen sogenannten *permissiven* T-Zell-Linien wie z.B. MT-4 oder C8166 können HIV-1-Mutanten mit definierten C-terminalen Trunkationen in Env eine vollständige Infektion etablieren.

Auch die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Virusmutanten mit Mutationen in Env-TMD (pNL-TmR-I und pNL-TmCD22) wurden hinsichtlich ihrer Replikationskinetiken schon beschrieben (Wilk *et al.*, 1996). In MT-4-Zellen wurde gezeigt, daß diese beiden Mutanten hinsichtlich ihrer Replikation einen ähnlichen Phänotyp aufweisen wie Wildtyp-Viren. In für Trunktationsmutanten nicht permissiven Zellen wurde die Replikation dieser beiden Mutanten noch nicht analysiert.

Zu Beginn der Arbeiten wurden die in 4.1 beschriebenen Virusmutanten hinsichtlich ihres Replikationsverhaltens in verschiedenen Zelllinien untersucht, um eine Aussage über das Ausmaß ihres Defekts treffen zu können.

4.2.1 Replikation in C8166- und H9-Zellen

Für die Replikationsanalyse der Mutanten wurden 293T-Zellen transient mit den entsprechenden proviralen Konstrukten transfiziert (siehe 3.3.3), die virushaltigen Transfektionsüberstände 48 Stunden nach Transfektion geerntet und bei -70°C aliquotiert gelagert. Für das Erstellen der Replikationskinetiken wurden jeweils 10⁶ C8166- oder H9-Zellen mit abgeglichenen Mengen (p24-ELISA, siehe 3.5.7) des Transfektionsüberstands infiziert und fünf Stunden nach Infektion ausgiebig gewaschen (siehe 3.4.1). Die Virusausbreitung in den Zellkulturen wurde anhand kontinuierlicher Messung der Menge neu synthetisierter Virionen (p24-ELISA) im Kulturüberstand und der Zahl HIV-Immunfluoreszenz-positiver Zellen (siehe 3.5.1) verfolgt. Abb. 4.3 zeigt die Replikation von pNL-Wt und den in 4.1 beschriebenen pNL-Derivaten in C8166- und H9-Zellen.

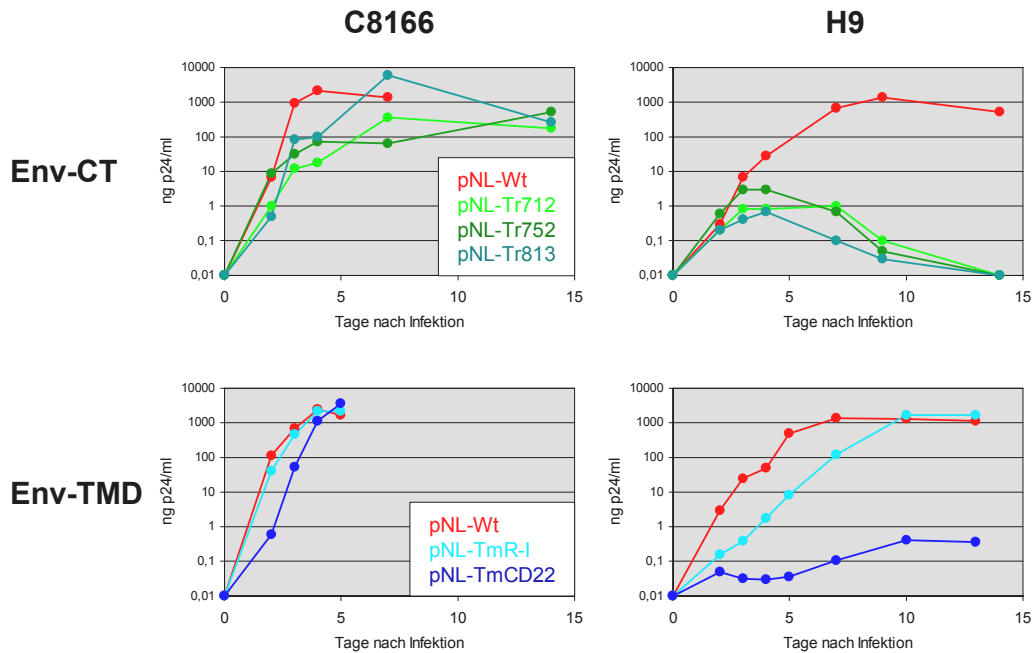


Abb. 4.3: Replikationskinetiken von pNL-Wt und pNL-Derivaten mit trunkierten (Env-CT) und transmembranal mutierten (Env-TMD) Env-Proteinen in C8166- und H9-Zellen.

Gezeigt sind die Replikationskinetiken von pNL-Wt, pNL-Tr712, pNL-Tr752, pNL-Tr813, pNL-TmR-I sowie pNL-TmCD22. Je 10^6 C8166- bzw. H9-Zellen wurden mit gleichen Mengen ($0,4 \mu\text{g}$ p24) aus transient transfizierten 293T-Zellen gewonnenem und bei -70°C gelagertem Virusüberstand infiziert, 5 Stunden nach Infektion gewaschen und in 2 ml RPMI^k-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage mit frischem Medium versehen und die Virusreplikation mittels Quantifizierung der Menge der in den Kulturüberstand neu freigesetzten Virionen verfolgt (p24-ELISA).

Wie man in Abb. 4.3 sehen kann, zeigten die Viren mit trunkierten Env-Proteinen den schon beschriebenen Zelltyp-abhängigen Phänotyp: in den permissiven C8166-Zellen konnten sie replizieren, allerdings in unterschiedlichem Maß verzögert im Vergleich zu pNL-Wt. Im Gegensatz dazu konnten die Trunktationsmutanten in H9-Zellen keine vollständige Infektion etablieren: zwar wurden zu Beginn der Replikationsverläufe jeweils geringe Mengen an Virionen freigesetzt, die sich jedoch nicht in der Kultur ausbreiten konnten. pNL-Wt breitete sich innerhalb von 9 Tagen in der H9-Kultur aus, danach kam es aufgrund HIV-1-vermittelter Zytopathie (Popovic *et al.*, 1984; Somasundaran und Robinson, 1987) zu einem Absterben der infizierten Zellen.

Virusmutanten mit Modifikationen in Env-TMD zeigten in C8166-Zellen einen ähnlichen Phänotyp wie pNL-Wt und hatten nach ca. vier Tagen die komplette Zellkultur durchinfiziert. In H9-Zellen konnte pNL-TmR-I ebenfalls replizieren, allerdings etwas verzögert im Gegensatz zu pNL-Wt. Dahingegen wies pNL-TmCD22 einen erheblich defekten Phänotyp auf: selbst an Tag 13 der Infektion war nur eine äußerst geringe Partikelfreisetzung zu beobachten.

Diese mit pNL-TmCD22 infizierte H9-Kultur wurde im Anschluß über einen längeren Zeitraum weitergeführt, um analysieren zu können, ob diese Mutante überhaupt in der Lage ist, die H9-Zellkultur komplett zu infizieren. Falls dies der Fall wäre, könnten möglicherweise *second site*-Mutationen in der proviralen DNA detektiert werden, die in der Lage sind, die Mutation in Env-TMD zu kompensieren und das Virus zu einer höheren Replikationskompetenz zu befähigen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in 4.3.1 eingehend beschrieben.

Der Verlauf sämtlicher Replikationen wurde auch mittels Immunfluoreszenz verfolgt. Dazu wurde ein Teil der jeweiligen infizierten Zellkultur entnommen, abzentrifugiert, einmal in PBS gewaschen und dann auf einen Objektträger aufgebracht. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen in einem Aceton-Methanol-Gemisch [1:1] erfolgte die Färbung der Präparate mit HIV-Patientenserum und einem FITC gekoppelten Zweitantikörper (siehe 3.5.1). Abb. 4.4 zeigt ausgewählte Immunfluoreszenzen der in Abb. 4.3 dargestellten Replikationsverläufe.

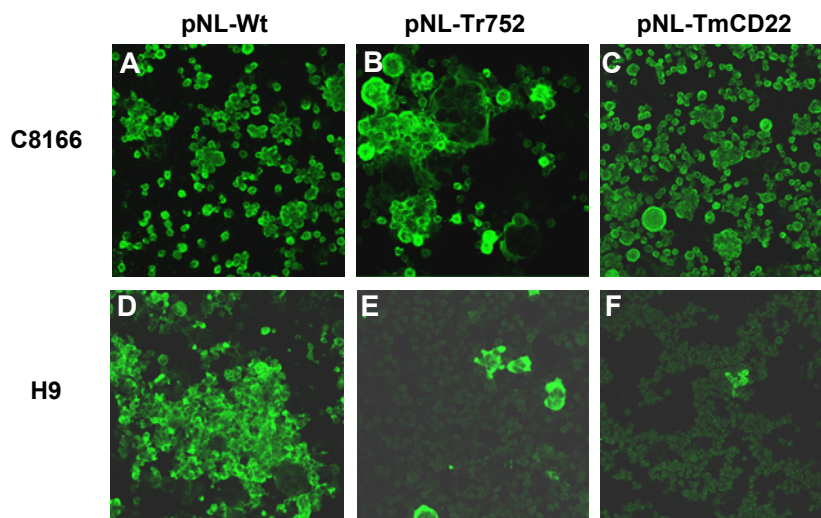


Abb. 4.4: Indirekte Immunfluoreszenzen mit pNL-Wt und pNL-Derivaten infizierter C8166- und H9-Zellen.

Gezeigt sind ausgewählte Immunfluoreszenzen infizierter C8166- und H9-Zellen der in Abb. 4.3 dargestellten Infektionen. Die Zellen wurden zum entsprechenden Zeitpunkt mit einem Aceton-Methanol-Gemisch fixiert und permeabilisiert; die Färbung erfolgte mit humanem HIV-Patienten-Serum und einem FITC-gekoppelten gt- α -hu-Zweitantikörper. **A-C:** infizierte C8166-Zellen 4 Tage nach Infektion. **D-F:** infizierte H9-Zellen 4 (E) bzw. 10 Tage nach Infektion (D und F). Die blasser gefärbten Zellen stellen uninfizierte Zellen dar.

Die indirekten HIV-1-Immunfluoreszenzen spiegeln die oben beschriebenen Replikationskurven wieder: C8166-Zellen, welche mit pNL-Tr752 sowie pNL-TmCD22

infiziert wurden, waren an Tag 4 zu etwa 80% (pNL-Tr752, Abb. 4.4 B) bzw. zu 100% (pNL-TmCD22, Abb. 4.4 C) infiziert. Im Fall der pNL-Tr752-Infektion konnte in den Präparaten eine gegenüber pNL-Wt und den transmembranalen Mutanten erhöhte Synzytienbildung beobachtet werden. Es traten mehr und teilweise auch erheblich größere Synzytien auf (Abb. 4.4 B). C8166-Zellen, die an einem Zeitpunkt später als Tag 4 des Replikationsverlaufs angefärbt wurden, zeigten in allen infizierten Zellkulturen schließlich den HIV-1-vermittelten zytopathischen Phänotyp auf, der zum Absterben der infizierten Zellen führte.

Im H9-Zellen wurden dagegen in pNL-Tr752-Infektionen nur wenige einzelne infizierte Einzelzellen oder kleinere Synzytien detektiert (Abb. 4.4 E). In Präparaten der pNL-Tr752-Infektion, welche nach Tag 4 auf HIV-1-Positivität hin analysiert wurden, waren dann schließlich keine HIV-1-positiven Zellen mehr zu detektieren, was auf ein Aussterben der wenigen infizierten Zellen schließen läßt. pNL-TmCD22 replizierte äußerst langsam in H9-Zellen und hatte auch nach 10 Tagen erst einen äußerst geringen Anteil der Kultur infiziert (Abb. 4.4 F).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die im Rahmen der Arbeit zu analysierenden Virusmutanten einen Zelltyp-abhängigen Phänotyp besitzen. In sogenannten permissiven C8166-Zellen konnten alle Mutanten, wenn auch teilweise mit Verzögerung, replizieren, während in nicht-permissiven H9-Zellen keine (Trunkationsmutanten) oder verzögerte (pNL-TmR-I) bzw. erheblich verzögerte (TmCD22) Virusreplikation beobachtet werden konnte.

4.2.2 Vergleich der Permissivität von MT-4- und C8166-Zellen

In früheren Experimenten (Wilk *et al.*, 1992), welche mit MT-4-Zellen als Vertreter der permissiven Zelllinien durchgeführt wurden, replizierte pNL-Tr712 fast genauso schnell wie pNL-Wt, während hier in C8166-Zellen eine verzögerte Replikation dieser Mutante beobachtet wurde (Abb. 4.3). Daher wurde vermutet, daß verschiedene permissive Zellen einen unterschiedlichen Phänotyp hinsichtlich der gleichen Virusmutante besitzen könnten. Aus diesem Grunde wurde in einer vergleichenden Analyse untersucht, wie sehr sich die Infektionsverläufe von Trunkationsmutanten in MT-4- und C8166-Zellen voneinander unterscheiden.

Die Replikationskinetiken wurden wie in 4.2.1 beschrieben durchgeführt, das Ergebnis der Analyse ist in Abb. 4.5 zu sehen.

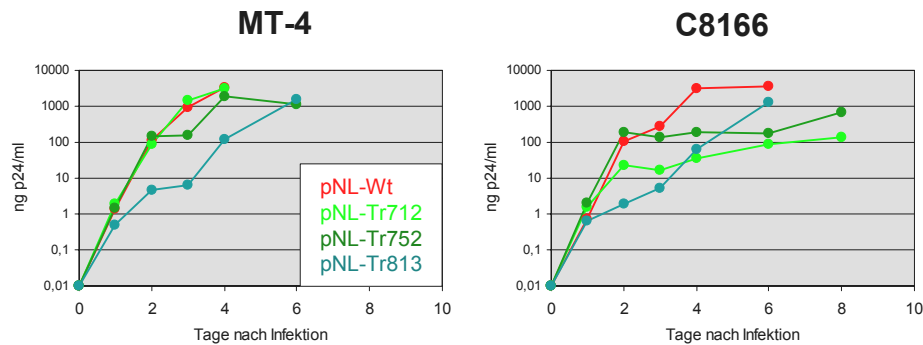


Abb. 4.5: Replikationskinetiken von pNL-Wt und pNL-Derivaten mit trunkierten Env-Proteinen in MT-4- und C8166-Zellen.

Gezeigt sind die Replikationskinetiken von pNL-Wt, pNL-Tr712, pNL-Tr752 und pNL-Tr813. Je 10^6 MT-4- bzw. C8166-Zellen wurden mit gleichen Mengen ($0,1 \mu\text{g p24}$) aus transient transfizierten 293T-Zellen gewonnenem und bei -70°C gelagertem Virusüberstand infiziert, 5 Stunden nach Infektion gewaschen und in 2 ml RPMI^k-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage mit frischem Medium versehen und die Virusreplikation mittels Quantifizierung der Menge der in den Kulturüberstand neu freigesetzten Virionen verfolgt (p24-ELISA).

Die Analyse ergab, daß MT-4- und C8166-Zellen tatsächlich einen unterschiedlichen Phänotyp in bezug auf die Replikation von Trunktionsmutanten aufweisen. pNL-Tr712 replizierte in MT-4-Zellen genauso schnell wie pNL-Wt (beide erreichten ihr Replikationsmaximum nach vier Tagen), während die Replikation dieser Mutante in C8166-Zellen verzögert war: selbst nach acht Tagen schien pNL-Tr712 noch nicht den Zeitpunkt maximaler Virusreplikation erreicht zu haben, während pNL-Wt bereits nach vier Tagen die gesamte Zellkultur infiziert hatte. Auch pNL-Tr752 replizierte deutlich schneller in MT-4-Zellen als in C8166-Zellen, während pNL-Tr813 in beiden Zelltypen ein ähnliches Replikationsverhalten aufwies.

Dieser Versuch zeigt, daß MT-4-Zellen permissiver für die Replikation von Virusmutanten mit Trunkationen in Env-CT sind als C8166-Zellen. Aufgrund dieses eindeutigeren Phänotyps wurden für die weiterführenden Analysen MT-4-Zellen als Vertreter des permissiven Zelltyps gewählt.

4.2.3 Versuche zur Aufhebung des nicht-permissiven Phänotyps von H9-Zellen

In den folgenden Versuchen wurde in zwei verschiedenen Ansätzen versucht, den nicht-permissiven Phänotyp von H9-Zellen für Virusmutanten mit Trunkationen in Env-CT aufzuheben und die Zellen durch Expression bestimmter Proteine permissiv für die Replikation dieser Mutanten zu machen.

Ein Gelingen dieses Unterfangens könnte relevante Hinweise betreffend der Gründe für die Permissivität gewisser Zelllinien preisgeben.

4.2.3.1 Expression von HTLV-1-Tax in H9-Zellen

Eine Eigenschaft, welche die in dieser Arbeit analysierten permissiven Zellen von nicht-permissiven Zellen unterscheidet, ist die Tatsache, daß sowohl MT-4- als auch C8166-Zellen mit dem Humanen T-Zell-Leukämie-Virus (HTLV-1) transformiert sind (Salahuddin *et al.*, 1983; Pauwels *et al.*, 1987) und HTLV-1-Tax exprimieren. Somit stellte sich die offensichtliche Frage, ob diese Zellen nur aufgrund der Expression dieses Proteins oder der daraus resultierenden Eigenschaften einen permissiven Phänotyp besitzen. Daher wurde untersucht, ob H9-Zellen durch konstitutive Expression von HTLV-1-Tax permissiv für Virusmutanten mit trunkierten Env-Proteinen werden, insbesondere für pNL-Tr712.

Um das Tax-Gen stabil in H9-Zellen einzubringen, wurde der Tax- und GFP-exprimierende Vektor pWPI-Tax verwendet, welcher von S. Fas, DKFZ Heidelberg, generiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Vektor basiert auf dem lentiviralen Vektor pWPI, welcher die cDNA für GFP stromabwärts einer EMCV-IRES trägt. Das gewünschte Transgen, in diesem Falle Tax, kann mittels eines einfachen Klonierungsschrittes vor diese Sequenzen inseriert werden. Man erhält so einen bizistronischen Vektor, der nach erfolgreicher Transduktion dazu führt, daß sowohl das Transgen als auch GFP von einer einzigen Boten-RNA in den jeweiligen Zielzellen synthetisiert werden. Diese Eigenschaft kann man sich zunutze machen, um erfolgreich transduzierte Zellen nach GFP-Fluoreszenz zu sortieren und somit theoretisch eine Zellpopulation zu erhalten, die zu 100% GFP und somit auch das Transgen exprimiert. Der Vektor pWPI-Tax ist schematisch in Abb. 4.6 dargestellt.



Abb. 4.6: Der bizistronische lentivirale Vektor pWPI-Tax.

Die Sequenzen des Vektors sind schematisch dargestellt und nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. Die beiden Transgene Tax und GFP sind farbig hervorgehoben. LTR = *long terminal repeat*, EF1α = *elongation factor 1α*-Promotor, cPPT = *central polypurine tract*, IRES = *internal ribosomal entry site*, WPRE = *woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*, SIN = *self-inactivating*.

Für die Produktion von VSV-G-pseudotypisierten Vektorpartikeln wurden 293T-Zellen wie in 3.3.3 beschrieben mit folgenden drei Konstrukten transient transfiziert: pMD.G, welches für das Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV-G) kodiert, pCMVΔ8.91, welches als Verpackungskonstrukt diente, sowie pWPI-Tax bzw. als Kontrolle pWPI. Die freigesetzten

Vektorpartikel wurden 72 Stunden nach Transfektion geerntet und mittels Ultrafiltration aufkonzentriert (siehe 3.3.5). Anschließend wurden je 500 µl der aufkonzentrierten Transfektionsüberstände in Anwesenheit von Polybren (8 µg/ml) wie in 3.4.3 beschrieben zu je 1 ml subkonfluenten H9-Zellen gegeben, die andere Hälfte der konzentrierten Vektorpartikel wurde bei -70°C gelagert. Nach Inkubation der Zellen bei 37°C über Nacht wurde der Ansatz zweimal in RPMI^k-Medium gewaschen und in frischem RPMI^k-Medium aufgenommen, gefolgt von einer Kultivierung und Expansion der Zellkultur über eine Woche hinweg. Nach einer weiteren Transduktion der Zellen mit den bei -70°C gelagerten Vektorpartikeln und einer weiteren Expansion dieser Zellkultur wurden die Zellen schließlich mit dem FACS-Gerät sortiert (Kooperation mit S. Fas, DKFZ, Heidelberg). Im folgenden werden mit pWPI transduzierte H9-Zellen mit H9-G und mit WPI-Tax transduzierte H9-Zellen mit H9-GT bezeichnet.

Abb. 4.7 zeigt die FACS-GFP-Analyse (siehe 3.5.2) der unsortierten ein- und zweifach transduzierten H9-Zellen sowie der sortierten zweifach transduzierten H9-Zellen.

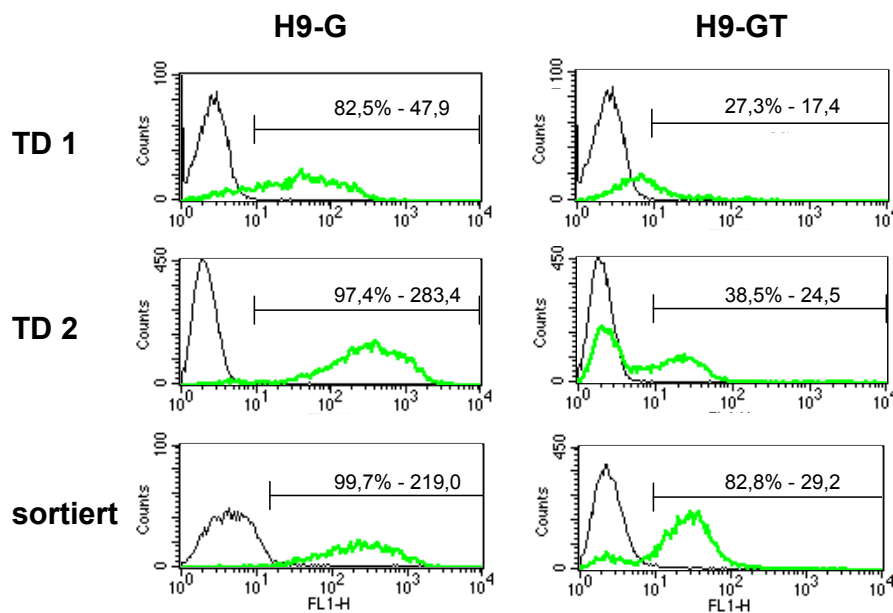


Abb. 4.7: FACS-GFP-Analyse von H9-G- und H9-GT-Zellen.

Gezeigt sind GFP-Analysen der einfach (TD 1) und der zweifach (TD 2) transduzierten H9-Zellen sowie der zweifach transduzierten und nach hoher GFP-Expression sortierten H9-Zellpopulationen (sortiert). H9-G = mit pWPI transduzierte H9-Zellen, H9-GT = mit pWPI-Tax transduzierte H9-Zellen. Über der jeweils in den Histogrammen eingezeichneten Markerlinie, welche die GFP-positiven von den GFP-negativen Zellen abgrenzt, sind der Anteil der GFP-positiven Zellen an der Gesamtzellpopulation sowie der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität angegeben. Für die FACS-Analyse wurden 5×10^6 Zellen abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und nach Aufnahme in 500 µl PBS im FACS-Gerät vermessen. Als Negativkontrolle (schwarze Kurve) dienten untransduzierte H9-Zellen.

Die in Abb. 4.7. dargestellte FACS-Analyse der transduzierten H9-Zellen ergab, daß nach einmaliger Transduktion 82,5% (H9-G) bzw. 27,3% (H9-GT) der Zellen positiv für die Expression von GFP waren. Durch die zweite Transduktion konnte die GFP-Positivität der beiden Zellpopulation wie erwartet noch gesteigert werden: 97,4% der H9-G-Zellen und 38,5% der H9-GT wiesen nun GFP-Expression auf. Durch Sortieren der Zellen nach dem Kriterium hoher GFP-Expression konnte schließlich eine H9-G-Zellpopulation erhalten werden, die zu fast 100% (99,7%) GFP-exprimierende Zellen enthielt. Die sortierte H9-GT-Zellpopulation war dagegen zum Zeitpunkt der FACS-Analyse, welche eine Woche nach Sortierung der Zellen stattfand, nur noch zu 82,8% GFP-positiv. Obwohl beim Sortieren nur H9-GT-Zellen mit relativ hoher GFP-Fluoreszenz berücksichtigt wurden und somit ebenfalls eine ca. 100%-ige GFP-Positivität zu erwarten war, schienen die Tax- und GFP-exprimierenden Zellen einen erheblichen Selektionsnachteil innerhalb der Zellpopulation zu besitzen, welche wohl selbst nach dem Sortieren neben transduzierten Zellen auch kontaminierende nicht transduzierte Zellen enthielt. Innerhalb einer Woche konnten die nicht transduzierten Zellen zu einem erheblichen Anteil (17,2%) an der Gesamtpopulation heranwachsen.

Auffallend ist außerdem, daß die mittlere Fluoreszenzintensität der H9-G-Zellen bei allen Messungen weitaus höher lag als die der H9-GT-Zellen. So betrug dieser Wert nach dem Sortieren für H9-G-Zellen 219,0, für H9-GT-Zellen nur 29,2.

Um nun untersuchen zu können, ob pNL-Tr712 in den ursprünglich für diese Virusmutante nicht permissiven und jetzt Tax-exprimierenden H9-Zellen eine vollständige Infektion etablieren kann, wurden je 10^6 H9-G- bzw. H9-GT-Zellen mit wie in 3.4.1 beschrieben mit in 293T-Zellen produzierten pNL-Wt- oder pNL-Tr712-Virionen infiziert und der Infektionsverlauf mittels p24-ELISA (siehe 3.5.7) verfolgt. Als Kontrolle für den Wachstum von pNL-Tr712 wurden außerdem 10^6 MT-4-Zellen mit pNL-Tr712 infiziert. Abb. 4.8 zeigt den Verlauf der Replikationskinetiken.

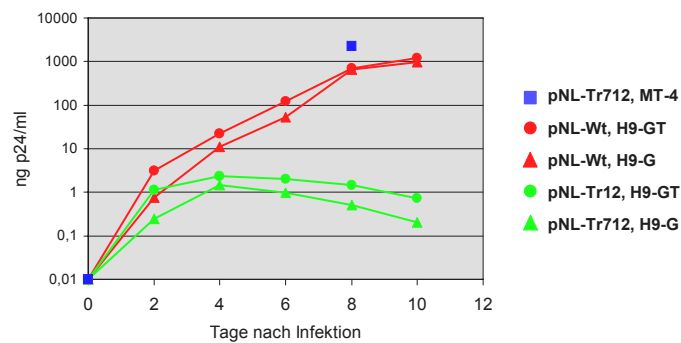


Abb. 4.8: Replikationskinetiken von pNL-Wt und pNL-Tr712 in H9-G- und H9-GT-Zellen.

Je 10^6 H9-G- bzw. H9-GT-Zellen wurden mit gleichen Mengen ($0,1 \mu\text{g}$ p24) aus transient transfizierten 293T-Zellen gewonnenem und bei -70°C gelagertem Virusüberstand infiziert, 5 Stunden nach Infektion gewaschen und in 2 ml RPMI^k-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage mit frischem Medium versehen und die Virusreplikation mittels Quantifizierung der Menge der in den Kulturüberstand neu freigesetzten Virionen verfolgt (p24-ELISA). Als Kontrolle für pNL-Tr712-Replikation wurden 10^6 MT-4-Zellen mit dieser Mutante infiziert, bei diesem Infektionsverlauf wurde nur ein Wert im p24-ELISA gemessen (Tag 8).

Nur pNL-Wt war in der Lage, in H9-G- bzw. H9-GT-Zellen effizient zu replizieren (rote Kurven). pNL-Tr712 konnte zwar in den permissiven MT-4-Zellen eine Infektion etablieren (blaues Quadrat, Tag 8), konnte aber weder in H9-G-Zellen (was auch erwartet wurde) noch in Tax-exprimierenden H9-GT-Zellen replizieren (grüne Kurven). Das bedeutet, daß Tax bzw. die Menge an in H9-GT-Zellen exprimiertem Tax nicht ausreichte, um den für pNL-Tr712 nicht-permissiven Phänotyp von H9-Zellen aufzuheben.

4.2.3.2 Expression des Env-CTs *per se* in H9-Zellen

Diesem Ansatz liegt die Annahme zugrunde, daß der C-Terminus von Env in nicht permissiven Zellen dazu benötigt wird, Bedingungen innerhalb der Zellen zu schaffen, die eine Replikation von HIV-1 ermöglichen. Dies könnte z.B. durch Induktion eines bestimmten zellulären Genexpressionsmusters oder durch Rekrutierung benötigter Proteine an die Plasmamembran geschehen. Es ist daher möglich, daß eine konstitutive Expression des C-Terminus von Env in H9-Zellen den nicht-permissiven Phänotyp aufheben und die ursprünglich nicht-permissiven Zellen für die Replikation von pNL-Tr712 zugänglich machen könnte.

Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurde untersucht, ob pNL-Tr712 in einer H9-Zellpopulation replizieren kann, die eine membrangebundene Form des Env-CTs exprimiert. Der hier für die Transduktion von H9-Zellen verwendete lentivirale Vektor pWPI-Env-TMD-

CT ist wie der im vorigen Abschnitt verwendete Vektor ein Derivat von pWPI, er enthält die beiden durch eine EMCV-IRES getrennten Transgene Env-TMD-CT und GFP. Das Env-Konstrukt besteht aus einem heterologen Signalpeptid des Proteins *tissue plasminogen activator*, welches den Transport des Proteins ins Endoplasmatische Retikulum garantieren soll, sowie den Domänen Env-TMD und Env-CT. Die Klonierungsstrategie, die zur Generierung des Konstrukts verwendet wurde, ist in 6.2.3 zu finden. Eine schematische Abbildung des Vektors ist in Abb. 4.9 zu sehen.



Abb. 4.9: Der bizistronische lentivirale Vektor pWPI-Env-TMD-CT.

Die Sequenzen des Vektors sind schematisch dargestellt und nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. Die beiden Transgene SP-TMD-C-Terminus und GFP sind farbig hervorgehoben. LTR = *long terminal repeat*, EF1α = *elongation factor 1α*-Promotor, cPPT = *central polypurine tract*, IRES = *internal ribosomal entry site*, WPRE = *woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*, SIN = *self-inactivating*.

Zur Durchführung der Replikationskinetiken wurde eine H9-Zellpopulation herangezogen, welche stabil mit diesem Vektor transduziert wurde, sie wird im folgenden mit H9-TMD-CT bezeichnet. Die Expression von Env-TMD-CT in diesen Zellen wurde mittels Western-Blot-Analysen nachgewiesen (Diplomarbeit W. Hildebrandt, Universität Heidelberg, 2004).

Für das Experiment wurden 10^6 H9- bzw. H9-TMD-CT-Zellen wie in 3.4.1 beschrieben mit in 293T-Zellen produzierten pNL-Wt- oder pNL-Tr712-Virionen infiziert und der Infektionsverlauf mittels p24-ELISA (siehe 3.5.7) verfolgt. Als Kontrolle für die Replikation von pNL-Tr712 wurden außerdem 10^6 MT-4-Zellen mit pNL-Tr712 infiziert. Abb. 4.10 zeigt den Verlauf der Replikationskinetiken.

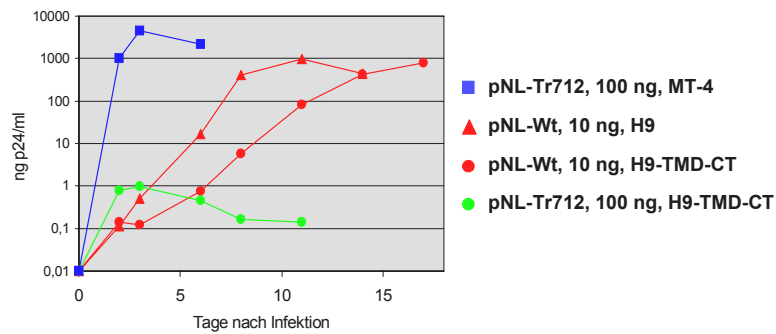


Abb. 4.10: Replikationskinetiken von pNL-Wt und pNL-Tr712 in H9- und H9-TMD-CT-Zellen.

Je 10^6 H9- bzw. H9-TMD-CT-Zellen wurden mit den in der Legende angegebenen p24-Mengen von in transient transfizierten 293T-Zellen gewonnenem und bei -70°C gelagertem Virusüberstand infiziert, 5 Stunden nach Infektion gewaschen und in 2 ml RPMI^k-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage mit frischem Medium versehen und die Virusreplikation mittels Quantifizierung der Menge der in den Kulturüberstand neu freigesetzten Virionen verfolgt (p24-ELISA). Als Kontrolle für die Replikation von pNL-Tr712 wurden ebenfalls 10^6 MT-4-Zellen mit dieser Mutante infiziert.

Wie man in Abb. 4.10 sehen kann, war nur pNL-Wt in der Lage, in H9- bzw. H9-Env-CT-TMD-Zellen zu replizieren (rote Kurven). Auffällig hierbei ist, daß die Replikation von pNL-Wt in den transduzierten H9-Env-CT-TMD-Zellen (rote Kreise) deutlich langsamer war als in nicht-transduzierten H9-Zellen (rote Dreiecke). Möglicherweise hatte die Expression zweier Transgene ein langsames Wachstum der Zellen und somit auch eine langsamere Virusreplikation zur Folge. pNL-Tr712 konnte zwar in den permissiven MT-4-Zellen in sehr kurzer Zeit eine Infektion etablieren (blaue Kurve). In H9-Env-CT-TMD-Zellen war diese Mutante allerdings nicht replikationskompetent (grüne Kurve).

Die hier erhaltenen Ergebnisse deuten somit nicht darauf hin, daß die Expression des Env-CTs *per se* in H9-Zellen den Phänotyp der Nicht-Permissivität für Virusmutanten mit trunkierten Env-Proteinen aufheben kann. Allein durch die Präsenz des Env-CTs wurden in H9-Zellen keine Bedingungen geschaffen, die eine Replikation von pNL-Tr712 erlaubt hätten.

4.3 Identifikation und Analyse von *second site*-Mutationen

Wie in den vorangegangenen Kapiteln erläutert wurde, besitzen Virionen mit Trunkationen in Env-CT und pNL-TmCD22 einen Zelltyp-abhängigen defekten Phänotyp. In einigen Fällen kommt es vor, daß durch Mutationen bedingte defekte Phänotypen durch die Entstehung von weiteren, sogenannten *second site*-Mutationen aufgehoben werden können. Wenn dies geschieht, gibt unter Umständen die Natur dieser zusätzlichen Mutationen Informationen über die Funktion der ursprünglich mutierten Region preis. Innerhalb dieser Arbeit wurden Varianten der Virusmutanten pNL-TmCD22 und pNL-Tr752 selektiert und untersucht.

4.3.1 Die Variante pNL-TmCD22'

Wie in 4.1. beschrieben ist pNL-TmCD22 ein pNL-Derivat, welches anstelle des homologen Membranankers von Env den Membrananker von CD22 besitzt. Diese Virusmutante repliziert fast so schnell wie der Wildtyp in C8166-Zellen, aber sehr langsam in H9-Zellen (siehe Abb. 4.3). Wie schon in 4.2 erwähnt, wurde dieser Infektionsansatz über einen längeren Zeitraum weiterverfolgt, um möglicherweise *second site*-Mutationen innerhalb der proviralen pNL-TmCD22-Sequenz identifizieren zu können, welche den defekten Phänotyp von pNL-TmCD22 kompensieren und das Virus zu einer schnelleren Replikation befähigen könnten. Es ist mit hoher Wahrscheinlichkeit damit zu rechnen, daß bei Selektion einer replikationskompetenteren Variante von pNL-TmCD22 *second site*-Mutationen aufgetreten sind, deren Eigenschaften Informationen betreffs der Funktion des Transmembranankers von HIV-1 preisgeben könnten.

Unter regelmäßigem Weitersplitten der infizierten Zellen und Zugabe uninfizierter H9-Zellen wurde die Kultur weitergeführt. Nach Langzeitkultur (5 Monate) erfolgten die Messung der Virionenkonzentration im Zellkulturüberstand (p24-ELISA, siehe 3.5.7) und die p24-Immunfluoreszenz-Analyse fixierter und permeabilisierter Zellen (siehe 3.5.1). Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abb. 4.11 dargestellt.

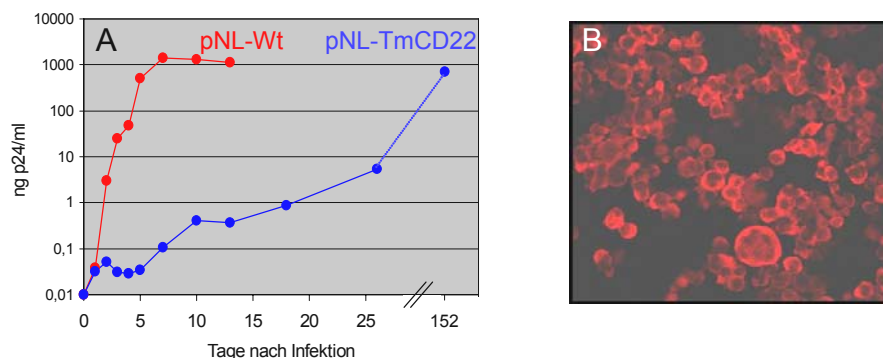


Abb. 4.11: Langzeitkultur mit pNL-TmCD22 infizierter H9-Zellen.

A. Gezeigt sind die Replikationskinetiken von pNL-Wt und pNL-TmCD22. 10^6 H9-Zellen wurden mit gleichen Mengen ($0,4 \mu\text{g p24}$) aus transient transfizierten 293T-Zellen gewonnenem und bei -70°C gelagertem Virusüberstand infiziert, 5 Stunden nach Infektion gewaschen und in 2 ml RPMI^k-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage mit frischem Medium versehen und die Virusreplikation mittels Quantifizierung der Menge der in den Kulturüberstand neu freigesetzten Virionen verfolgt (p24-ELISA). An Tag 26 erfolgte die Erhöhung des Volumens der infizierten Zellen auf 10 ml. Wöchentlich wurden der infizierten Kultur ca. 5 ml uninfizierte subkonfluente H9-Zellen zugeführt. **B.** Die infizierten H9-Zellen wurden nach fünfmonatiger Langzeitkultur mit einem Aceton-Methanol-Gemisch fixiert und permeabilisiert, die Färbung erfolgte mit dem murinen monoklonalen p24-Antikörper Mab183 und einem Alexa⁵⁹⁴-gekoppelten gt- α -mo-Zweitantikörper.

Die Replikationskinetik zeigt wie schon in Abb. 4.3, wie langsam pNL-TmCD22 in H9-Zellen replizierte: selbst an Tag 26 der Kinetik wies der Zellkulturüberstand nur eine relativ geringe p24-Konzentration auf, während pNL-Wt bereits an Tag 7 der Kinetik die komplette H9-Kultur infiziert hatte. Nach fünfmonatiger Weiterführung der Kultur wies die p24-Konzentration im Zellkulturüberstand der pNL-TmCD22-Infektion einen Wert auf, der im Bereich der Konzentration von pNL-Wt-Infektionen liegt, und die Immunfluoreszenz-Analyse fixierter und permeabilisierter infizierter H9-Zellen zeigte, daß diese zu 100% p24 exprimierten.

Da es möglich war, daß *second site*-Mutationen im viralen Genom entstanden waren, die es pNL-TmCD22 ermöglichten, die gesamte H9-Kultur zu infizieren, wurde zur Isolierung der potentiellen Variante pNL-TmCD22' der Kulturüberstand gefiltert (\varnothing 0,45 μ m) und bei -70°C eingefroren. Die infizierten Zellen wurden für eine weiterführende Sequenzanalyse der proviralen DNA in flüssigem Stickstoff gelagert. Für vergleichende Analysen wurden pNL-Wt-Virionen ebenfalls in H9-Zellen durch eine herkömmliche Infektion (siehe 3.4.1) produziert.

Um die Replikationskompetenz der potentiellen Variante zu untersuchen, wurden H9-Zellen mit gleichen Mengen pNL-TmCD22' und pNL-Wt (aus H9-Zellen stammend) infiziert. Außerdem wurden zum Vergleich auf p24 abgeglichene Zellkulturüberstände aus transient mit pNL-Wt und pNL-TmCD22 transfizierten 293T-Zellen für die Infektion verwendet (siehe 3.4.1). Bei dieser vergleichenden Kinetik wurde analysiert, wie schnell die Replikation von pNL-TmCD22' im Vergleich zu pNL-Wt ist, und ob diese selektierte potentielle Variante pNL-TmCD22' effizienter replizieren kann als die ursprüngliche Mutante pNL-TmCD22. Das Ergebnis der Analyse ist in Abb. 4.12 dargestellt.

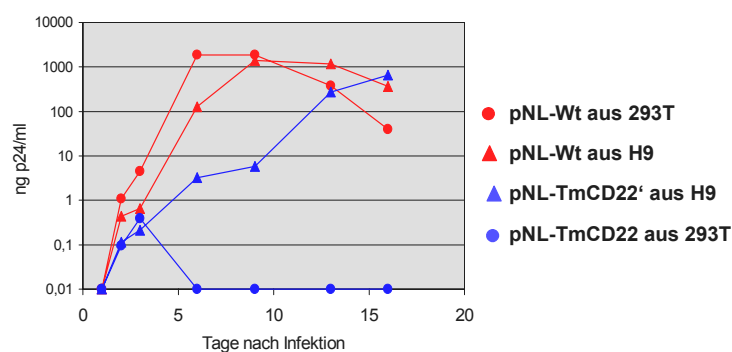


Abb. 4.12: Replikation von pNL-TmCD22' und pNL-TmCD22 in H9-Zellen.

Gezeigt sind die Replikationskinetiken im Vergleich zu pNL-Wt. Je 10^6 H9-Zellen wurden mit gleichen Mengen (0,1 μ g p24) folgender Virusmutanten infiziert: pNL-TmCD22' und pNL-Wt (Virusüberstände aus H9-Infektionen) sowie pNL-TmCD22 und pNL-Wt (Virusüberstände aus 293T-Transfektionen). 5 Stunden nach Infektion wurden die Zellen gewaschen und in 2 ml RPMI^k-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage mit frischem Medium versehen und die Virusreplikation mittels Quantifizierung der Menge der in den Kulturüberstand neu freigesetzten Virionen verfolgt (p24-ELISA).

Wie man der Grafik entnehmen kann, konnte pNL-Wt in H9-Zellen eine vollständige Infektion etablieren (rote Kurven). pNL-TmCD22' replizierte deutlich langsamer als pNL-Wt, konnte aber innerhalb von 15 Tagen die H9-Kultur vollständig infizieren (blaue Dreiecke). Im Gegensatz dazu steht die Replikationskinetik von pNL-TmCD22: im Falle der aus 293T-Zellen stammenden Mutante konnte in diesem Experiment keine sich ausbreitende Infektion beobachtet werden. Nach anfänglicher Virusreplikation, innerhalb derer nur geringe Mengen neugebildeter Virionen freigesetzt wurden, stagnierte die Virusreplikation (blaue Kreise).

Potentielle *second site*-Mutationen wurden vor allem in *env* vermutet, weiterhin sollte aber auch *matrix* analysiert werden, da eine Interaktion von Matrix mit Env gezeigt worden ist (Cosson, 1996; Murakami und Freed, 2000b). Für die Analysen wurden die wie oben beschrieben eingefrorenen infizierten Zellen aufgetaut, und die genomische DNA wie in 3.2.11 beschrieben präpariert und aufgereinigt. Daraufhin erfolgten PCR-Amplifizierungen der proviralen *env*- und *matrix*-Gene nach dem Standard-Protokoll in einer *nested* PCR (siehe 3.2.12.1). Diese Fragmente wurden sequenziert und die erhaltene Nukleotidsequenz mit der Sequenz von pNL-TmCD22 verglichen. Das Ergebnis dieser Analyse sowie die verwendeten Oligonukleotide und die Größe der amplifizierten Fragmente sind in Tab. 4.1 zusammengefaßt.

Tab. 4.1: Sequenzanalyse von pNL-TmCD22'

	Oligonukleotide erste PCR, Fragmentgröße	Oligonukleotide <i>nested</i> PCR, Fragmentgröße	Oligonukleotide für Sequenzierung	Sequenzunter- schiede zu pNL-Wt
<i>env</i> erste Hälfte	23, 286 = 2780 bp	319, 320 = 1820 bp	319, 320, 321, 322, 323	6463 C → T (Ala → Val)
<i>env</i> zweite Hälfte	1, 38 = 1276 bp	81, 38 = 941 bp	81, 38, 18	-
<i>matrix</i>	324, 325 = 1029 bp	326, 327 = 830 bp	326, 327	-

Angegeben sind die für die Amplifikation und die Sequenzierung der jeweiligen DNA-Abschnitte benutzten Oligonukleotide und die in den Fragmenten detektierten Mutationen. Nähere Angaben zu den einzelnen Oligonukleotiden sind in 6.1 zu finden.

Es wurde nur eine Mutation im gesamten *env*- und *matrix*-Bereich identifiziert. Diese liegt in *env* an Position 6463 (BH10-Nummerierung). Der Nukleotidaustausch führt zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Valin an Position 70 im Env-Protein (40 Aminosäuren nach dem Ende des Env-Signalpeptids). Dies bedeutet, daß entweder diese Mutation alleine

oder in Kombination mit anderen, hier nicht detektierten Mutationen außerhalb von *env* und *matrix* für den Phänotyp von pNL-TmCD22' verantwortlich sein muß.

Da pNL-TmCD22' jedoch nicht in PBMCs wachsen konnte (Daten nicht gezeigt), wurde im Rahmen der Arbeit darauf verzichtet, den Aminosäureaustausch in die Nukleotidsequenz von pNL-TmCD22 einzubringen, um zu überprüfen, ob dieser As-Austausch alleine der Grund für die gesteigerte Replikationskompetenz von pNL-TmCD22' in H9-Zellen ist.

4.3.2 Die Variante pNL-Tr752(N750K)

In einer früheren Studie (Wilk *et al.*, 1992) wurden, wie schon in 4.1 erwähnt, Eigenschaften verschiedener Trunktationsmutanten beschrieben, darunter wurde auch pNL-Tr752 analysiert, dessen Env-Protein einen verkürzten C-Terminus von nur 47 Aminosäuren besitzt. Diese Mutante weist im Vergleich zu pNL-Wt in permissiven Zellen hinsichtlich der Replikationsgeschwindigkeit einen etwas verzögerten Phänotyp auf. In der eben erwähnten Studie von 1992 konnte nach Überführung des Zellkulturüberstandes einer infizierten MT-4 Kultur auf frische MT-4-Zellen eine Viruspopulation selektiert werden, welche eine beschleunigte Replikationskinetik aufwies. Nach Isolierung und Sequenzierung der proviralen DNA der infizierten Zellen konnte gezeigt werden, daß das Stop-Kodon an Position 753 nicht revertiert war, sondern daß das Env-Protein von pNL-Tr752 immer noch verkürzt vorlag. Allerdings konnte eine *second site*-Mutation in unmittelbarer Nähe des verfrüht eingefügten Stop-Kodons identifiziert werden, nämlich ein Aminosäureaustausch an Position 750 von Asparagin (N) zu Lysin (K), kurz mit N750K bezeichnet.

Bei diesem zusätzlichen Aminosäureaustausch an Position 750 wird der überlappende *rev*-Leserahmen nicht verändert. In der besagten Publikation wurde allerdings nur der Bereich von *env* sequenziert, der sich über den C-terminalen Bereich erstreckt. So wurde nicht eindeutig geklärt, ob allein diese einzige Punktmutation ausreichte, um pNL-Tr752 replikationskompetenter zu machen, oder ob eventuell andere, in der damaligen Studie nicht detektierte Mutationen in der für den extrazellulären Bereich von Env kodierenden Region oder in anderen Bereichen des Genoms zu diesem veränderten Phänotyp beigetragen haben.

Zur Generierung von pNL-Tr752(N750K) wurde die N750K-Mutation in das einfach mutierte Provirus pNL-Tr752 mittels Fusions-PCR eingefügt, die Klonierungsstrategie ist in 6.2.2 zu finden. Weiterhin wurde die N750K-Mutation in pNL-Wt eingefügt: durch Inserieren des *BsaBI/BamHI*-Fragments aus pNL-Tr752(N750K) in das mit ebenfalls diesen Enzymen

geschnittene Konstrukt pNL-Wt wurde die Virusmutante pNL-Wt(N750K) generiert. Abb. 4.13 zeigt die neu generierten Konstrukte im Vergleich zu pNL-Wt und pNL-Tr752.

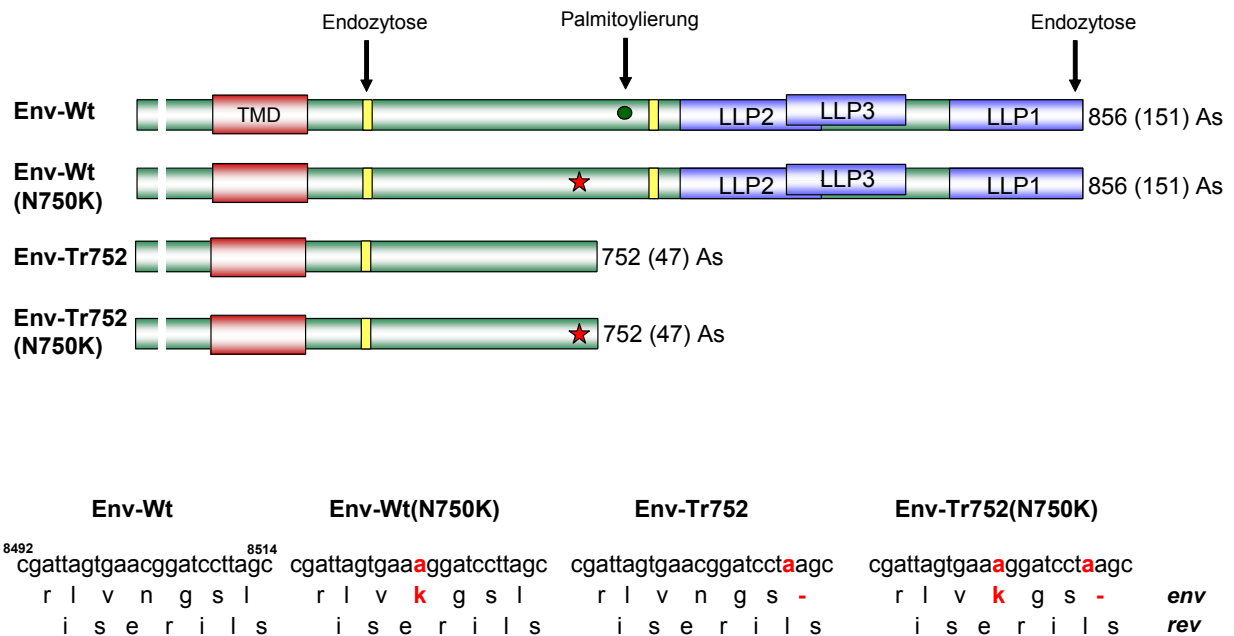


Abb. 4.13: Die N750K-Mutation im Kontext von pNL-Wt und pNL-Tr752.

Die Abbildung stellt die Env-Proteine von pNL-Wt, pNL-Tr752, pNL-Tr752(N750K) und pNL-Tr752(N750K) schematisch dar. Abgebildet ist jeweils die gp41-Untereinheit von Env, wobei die extrazelluläre Domäne verkürzt dargestellt ist. Am Ende der Proteine ist jeweils die Länge der Polypeptidkette des gesamten Env-Proteins angegeben, in Klammern dahinter die Anzahl der zytoplasmatischen Aminosäuren. Detaillierte Informationen zu den hier dargestellten Motiven und Bereichen sind in Kapitel 1.5.2.1 zu finden. Darunter gezeigt sind Ausschnitte der jeweiligen Nukleotidsequenzen, die Nummerierungen sind von BH10 abgeleitet. Darunter zu sehen sind die translatierten Aminosäuresequenzen des offenen *env*- bzw. *rev*- Leserahmens. Von pNL-Wt abweichende Nukleotide bzw. Aminosäuren sind rot markiert. As = Aminosäuren, LLP = *lentiviral lytic peptide*, TMD = Transmembrandomäne.

Um die Replikation der neu generierten Mutanten zu untersuchen, wurden wie in 3.5.1 beschrieben 10^6 MT-4- bzw. H9-Zellen mit abgeglichenen Mengen von virushaltigem 293T-Transfektionsüberstand infiziert und der Verlauf der Infektion mittels p24-ELISA (siehe 3.5.7) und Immunfluoreszenz gegen p24 (siehe 3.5.1) verfolgt. Die Ergebnisse der Infektionsverläufe sind in Abb. 4.14 dargestellt.

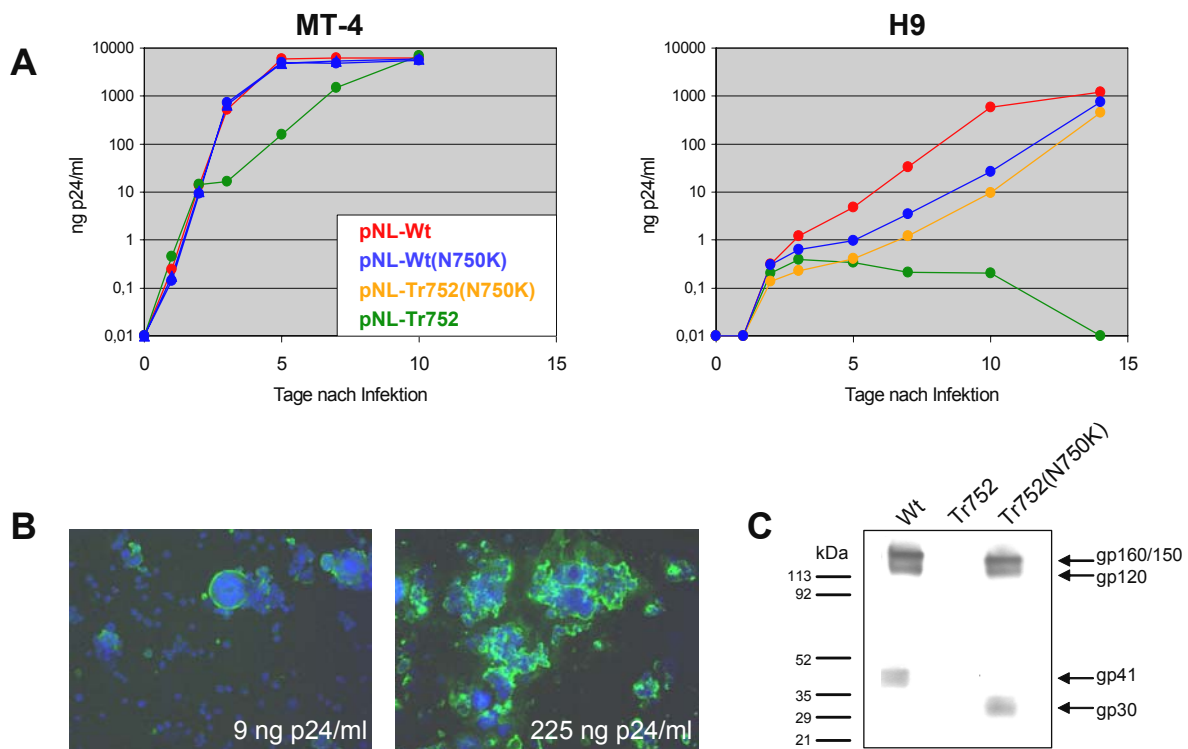


Abb. 4.14: Replikation von pNL-Tr752(N750K) in MT-4- und H9-Zellen.

A. Gezeigt sind die Replikationskinetiken von pNL-Wt, pNL-Wt(N750K), pNL-Tr752 und pNL-Tr752(N750K) in MT-4- und H9-Zellen. Je 10^6 MT-4- bzw. H9-Zellen wurden mit gleichen Mengen ($0,1\mu\text{g}$ p24) aus transient transfizierten 293T-Zellen gewonnenem und bei -70°C gelagertem Virusüberstand infiziert, 5 Stunden nach Infektion gewaschen und in 2 ml RPMI^k-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage mit frischem Medium versehen und die Virusreplikation mittels Quantifizierung der Menge der in den Kulturüberstand neu freigesetzten Virionen verfolgt (p24-ELISA). **B.** Ausgewählte repräsentative Doppelimmunfluoreszenzen mit pNL-Tr752(N750K) infizierter H9-Zellen. Die Zellen wurden an einem frühen Zeitpunkt der Infektion (links) und an einem späten Zeitpunkt der Infektion (rechts) - die p24-Konzentrationen im Überstand der infizierten Kultur sind jeweils angegeben - mit einem Aceton-Methanol-Gemisch fixiert und permeabilisiert, die Färbung erfolgte mit dem murinen monoklonalen p24-Antikörper Mab183 und einem Alexa⁴⁸⁸-gekoppelten gt- α -mo-Zweitantikörper, Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. **C.** Western-Blot-Analyse von H9-Zellysaten an Tag 14 des Infektionsverlaufs. Der obere Teil des Blots wurde mit einem rb- α -gp120-Antikörper und der untere Teil mit Chessie 8 gegen gp41 gefärbt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpern und ECL. Am oberen Rand der Abbildung sind die jeweiligen pNL-Derivate angegeben, mit welchen die H9-Zellen infiziert wurden, die Positionen der jeweiligen Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

pNL-Tr752 konnte in MT-4-Zellen im Vergleich zu pNL-Wt mit Verzögerung replizieren. Die neu generierte Virusmutante pNL-Tr752(N750K) dagegen replizierte in MT-4-Zellen genauso schnell wie pNL-Wt und pNL-Wt(N750K) zeigte in MT-4-Zellen keinen veränderten Phänotyp im Vergleich zu pNL-Wt.

In H9-Zellen konnte pNL-Tr752 wie erwartet keine Infektion etablieren. Dagegen konnte das neu generierte Virus pNL-Tr752(N750K) die H9-Kultur vollständig infizieren, obwohl es im Vergleich zu pNL-Wt eine deutlich verzögerte Replikationsgeschwindigkeit aufwies. Auch

pNL-Wt(N750K) replizierte in H9-Zellen langsamer als pNL-Wt, aber immer noch schneller als pNL-Tr752(N750K).

Ein Teil der verlangsamten Replikation von pNL-Tr752(N750K) ist daher auf das Vorhandensein der N750K-Mutation *alleine* zurückzuführen, da die Variante pNL-Wt(N750K), welche sowohl diese Mutation als auch einen Env-CT voller Länge besitzt, mit einer Geschwindigkeit replizierte, die zwischen der von pNL-Wt und pNL-Tr752(N750K) lag.

Auch in indirekten p24-Immunfluoreszenzen von mit pNL-Tr752(N750K) infizierten H9-Zellen, die auszugsweise in Abb. 4.14 B dargestellt sind, ließ sich der Infektionsverlauf verfolgen. Zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion sind wenige, aber auffallend große Synzytien zu erkennen (linkes Bild der Abbildung), an einem späteren Zeitpunkt der Infektion (rechtes Bild der Abbildung) ist die ganze H9-Kultur vollständig infiziert, erste Anzeichen HIV-1-induzierter Zytopathie, welche dann schließlich dann auch zum Absterben der infizierten Zellen führte, sind bereits zu erkennen.

Um zu analysieren, ob das Env-Protein von pNL-Tr752(N750K) immer noch verkürzt vorlag, oder ob es zu einer Reversion zu einem Env-Protein voller Länge gekommen war, was zu dem replikationskompetenteren Phänotyp von pNL-Tr752(N750K) führen würde, wurden an Tag 14 der Infektion H9-Zellysate (siehe 3.5.6) nach SDS-PAGE (siehe 3.5.3) einer Western-Blot-Analyse (siehe 3.5.4) unterzogen, die in Abb. 4.14 C dargestellt ist. Während in den Lysaten der H9-Zellen, welche mit pNL-Wt infiziert wurden, gp41 detektiert werden konnte, ist in den Lysaten der pNL-Tr752(N750K)-Infektion nur das trunkierte gp30-Protein zu erkennen. In beiden Fällen sind außerdem die gp120-Banden und die gp160- bzw. 150-Banden zu erkennen. In den Lysaten der pNL-Tr752-Infektion sind keinerlei Env-Proteine zu detektieren. Dieses Virus replizierte nicht in H9-Zellen, daher ist in diesen Zellen an Tag 14 keine Expression viraler Proteine detektierbar.

Um dieses Ergebnis auf DNA-Ebene zu bestätigen, wurde ebenfalls an Tag 14 der Infektion provirale DNA aus den H9-Zellen isoliert, amplifiziert und sequenziert (siehe 3.2.11 und 3.2.12.1). Durch die Sequenzanalyse konnte ebenfalls bestätigt werden, daß in der proviralen pNL-Tr752(N750K)-DNA das Stop-Kodon an Position 753 immer noch vorhanden war.

Diese Ergebnisse zeigen, daß ausschließlich der in pNL-Tr752 eingefügte Aminosäureaustausch an Position 750 von Asparagin zu Lysin das Virus zu einer gesteigerten Replikationskompetenz befähigte: in MT-4-Zellen replizierte Tr752(N750K) genauso schnell wie pNL-Wt, und in H9-Zellen replizierte diese Mutante etwas verlangsamt im Gegensatz zu pNL-Wt.

4.3.2.1 Reselektion von pNL-Tr752(N750K)

Im Rahmen einer Wiederholung des in 4.3.2 beschriebenen Replikationsexperiments konnte beobachtet werden, daß die Mutante pNL-Tr752, welche normalerweise in H9-Zellen keine vollständige Infektion etablieren kann, zwischen den Tagen 9 und 17 der H9-Infektion eine erheblich beschleunigte Replikationsgeschwindigkeit aufwies. Bei diesem Experiment wurden von jedem pNL-Derivat jeweils zwei unterschiedliche p24-Mengen für die initiale Infektion benutzt, nämlich 1 µg und 0,1 µg p24, der Übersichtlichkeit halber sind in der in Abb. 4.15 dargestellten Replikationskinetik nur für pNL-Tr752 beide Replikationskurven zu sehen.

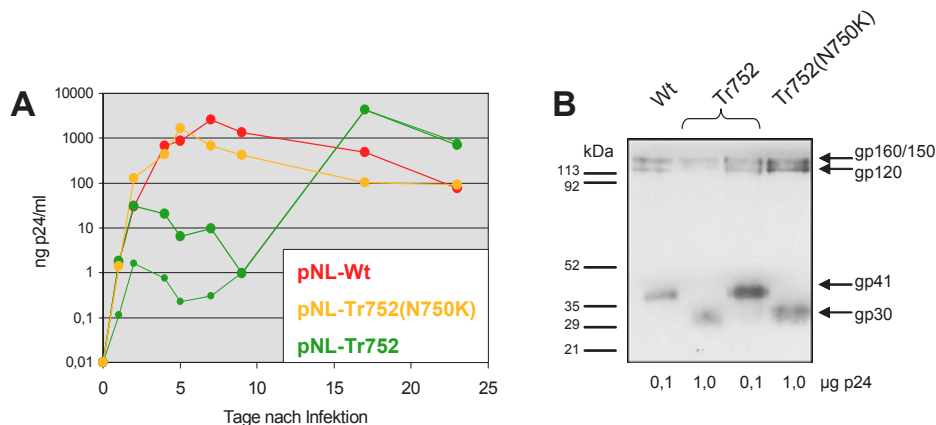


Abb. 4.15: Reselektion von pNL-Tr752(N750K) in H9-Zellen.

A. Gezeigt sind die Replikationskinetiken von pNL-Wt, pNL-Tr752 und pNL-Tr752(N750K) in H9-Zellen. Je 10^6 H9-Zellen wurden mit gleichen Mengen (1 µg bzw. 0,1 µg p24 (dünne Linie, nur gezeigt bei pNL-Tr752-Infektion)) aus transient transfizierten 293T-Zellen gewonnenem und bei -70°C gelagertem Virusüberstand infiziert, 5 Stunden nach Infektion gewaschen und in 2 ml RPMI^k-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage mit frischem Medium versehen und die Virusreplikation mittels Quantifizierung der Menge der in den Kulturüberstand neu freigesetzten Virionen verfolgt (p24-ELISA). **B.** Western-Blot-Analyse von H9-Zelllysaten am Tag 20 der Infektion. Der obere Teil des Blots wurde mit einem rb- α -gp120-Antikörper und der untere Teil mit Chessie 8 gegen gp41 gefärbt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpern und ECL. Am oberen Rand der Abbildung sind die jeweiligen pNL-Derivate angegeben, mit welchen die H9-Zellen infiziert wurden, die Positionen der detektierten Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die p24-Mengen, welche für die jeweilige Infektion benutzt wurden, sind unterhalb des Blots angegeben.

Wie man in Abb. 4.15 A sehen kann, waren die H9-Zellen innerhalb dieses Experimentes außergewöhnlich permissiv für pNL-Tr752(N750K): die neu generierte Variante replizierte so schnell wie pNL-Wt, was auch in den Infektionen, welche mit einer p24-Menge von 0,1 µg initiiert wurden, beobachtet werden konnte (Kurven nicht gezeigt). pNL-Tr752 zeigt wie erwartet eine anfängliche Replikation auf relativ niedrigem Niveau, beide Infektionsverläufe fielen dann nach Erreichen dieses Replikationsmaximums ab. Die Replikation hörte aber

nicht wie erwartet auf, sondern es konnte wie oben schon erwähnt zwischen den Tagen 9 und 17 beider pNL-Tr752-Infektionen eine beschleunigte Replikation der Virusmutante beobachtet werden. Diese deutete auf ein Entstehen weiterer replikationskompetenter Varianten von pNL-Tr752 oder auf eine Reversion des Stop-Kodons innerhalb des *env*-Leserahmens an Position 753 hin.

Western-Blot-Analysen von Zellysaten der infizierten H9-Zellen (Abb. 4.15 B) zeigen, daß das Env-Protein in einem Fall der pNL-Tr752-Infektion (1,0 µg p24-Einsatz) immer noch verkürzt als gp30 vorlag (zum Vergleich kann gp30 aus der pNL-Tr752(N750K)-Infektion herangezogen werden), während im anderen Fall (0,1 µg p24-Einsatz) eine Reversion zu einem Env-Protein voller Länge stattgefunden hatte: die gp41-Bande läuft hier auf gleicher Höhe wie die gp41-Bande der pNL-Wt-Infektion.

Die Sequenzanalyse der proviralen DNA der infizierten H9-Zellen (siehe 3.2.11 und 3.2.12.1) zu diesem Zeitpunkt bestätigte die Ergebnisse des Western Blots. Die Reversion zu einem Env-Protein voller Länge innerhalb einer pNL-Tr752-Infektion (0,1 µg p24-Einsatz) fand durch eine erneute Punktmutation statt, so daß das Stop-Kodon an Position 753 (TAA) zu Tyrosin (TAT) mutierte (anstatt Leucin (TTA) in *env* von pNL-Wt). Hierdurch kam es auch zu einer Änderung im überlappenden *rev*-Leserahmen: statt für Serin wird an As-Position 61 für Cystein kodiert. Die Funktion des Rev-Proteins schien jedoch dadurch nicht eingeschränkt zu sein, was man am erfolgreichen Infektionsverlauf sehen konnte.

Die Analyse der proviralen DNA der anderen pNL-Tr752-Infektion (1,0 µg p24-Einsatz) ergab, daß das Stop-Kodon an Position 753 erhalten geblieben war. Dafür hatte erneut an Position 750 der Aminosäureaustausch von Asparagin zu Lysin stattgefunden, d.h. die von pNL-Tr752 abgeleitete Variante pNL-Tr752(N750K) konnte erneut selektiert werden.

4.3.2.2 Replikation von pNL-Tr752(N750K) in PBMCs

Nachdem gezeigt werden konnte, daß pNL-Tr752(N750K) in H9-Zellen replizieren kann, wurde untersucht, ob dies auch in PBMCs der Fall ist. Aus peripherem Blut isolierte PBMCs, die mit PHA und IL-2 aktiviert wurden, stellen den Zelltyp dar, der der *in vivo*-Situation am nächsten kommt.

Für die Infektion wurden bei -70°C gelagerte PBMCs aufgetaut und nach 48-stündiger Aktivierung mit PHA und IL-2 mit auf p24 abgeglichenen Mengen von in 293T-Zellen produzierten Virionen infiziert (siehe 3.4.1). Der Replikationsverlauf wurde per p24-ELISA verfolgt (siehe 3.5.7). Abb. 4.16 zeigt die Replikationskinetiken von pNL-Wt, pNL-Tr752 und pNL-Tr752(N750K) in PBMCs.

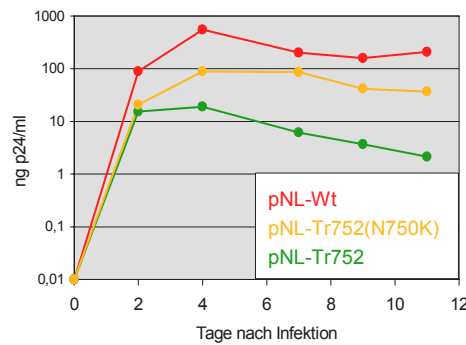


Abb. 4.16: Replikation von pNL-Tr752(N750K) in PBMCs.

Je 10^6 mit PHA (1 $\mu\text{g/ml}$) und IL-2 (25 U/ml) aktivierte PBMCs wurden mit gleichen Mengen (0,1 μg p24) aus transient transfizierten 293T-Zellen gewonnenem und bei -70°C gelagertem Virusüberstand infiziert, 5 Stunden nach Infektion gewaschen und in 2 ml RPMI^K-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage mit PHA- und IL-2-haltigem frischem Medium versehen und die Virusreplikation mittels Quantifizierung der Menge der in den Kulturüberstand neu freigesetzten Virionen verfolgt (p24-ELISA).

Wie man in der Replikationskinetik sehen kann, ist Tr752(N750K) auch in PBMCs replikationskompetent. Wie in H9-Zellen replizierte diese Virusmutante auch in PBMCs langsamer als pNL-Wt, während pNL-Tr752 sich in diesem Zellsystem nicht ausbreiten konnte. Die Präsenz des Stopkodons an Position 753 sowie die N750K-Mutation wurden durch Sequenzierung der proviralen pNL-Tr752(N750K)-DNA von Zellen, welche an Tag 11 der Infektion isoliert wurden, bestätigt (siehe 3.2.11 und 3.2.12.1).

4.3.2.3 Die N750K-Mutation im Kontext von pNL-Tr813

In den vorigen Kapiteln wurde gezeigt, daß alleine die N750K-Mutation die in nicht-permissiven H9-Zellen oder aktivierten und stimulierten PBMCs defekte Mutante pNL-Tr752 zu Replikationskompetenz befähigt. Dies bedeutet, daß diese Mutation erheblichen Einfluß auf das Replikationsverhalten des Virus haben muß. Daher wurde untersucht, wie sich die N750K-Mutation auf das Replikationsverhalten der Mutante pNL-Tr813 auswirkt, die für ein trunkiertes Env-Protein von nur 813 Aminosäuren Länge kodiert.

Durch Inserieren des *BsaBI/BamHI*-Fragments des proviralen Expressionsplasmids pNL-Tr752(N750K) in das mit diesen Enzymen geschnittene Plasmid pNL-Tr813 wurde pNL-Tr813(N750K) generiert.

Für die Untersuchung der Replikationsfähigkeit der neuen pNL-Tr813-Variante wurden 293T-Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transient transfiziert (siehe 3.3.3) und der virushaltige Transfektionsüberstand 48 Stunden nach Transfektion geerntet.

Anschließend erfolgte die Infektion von je 10^6 MT-4- und H9-Zellen mit auf p24 abgeglichenen Mengen der jeweiligen Virusüberstände (siehe 3.4.1). Die Replikationsverläufe sind in Abb. 4.17 dargestellt.

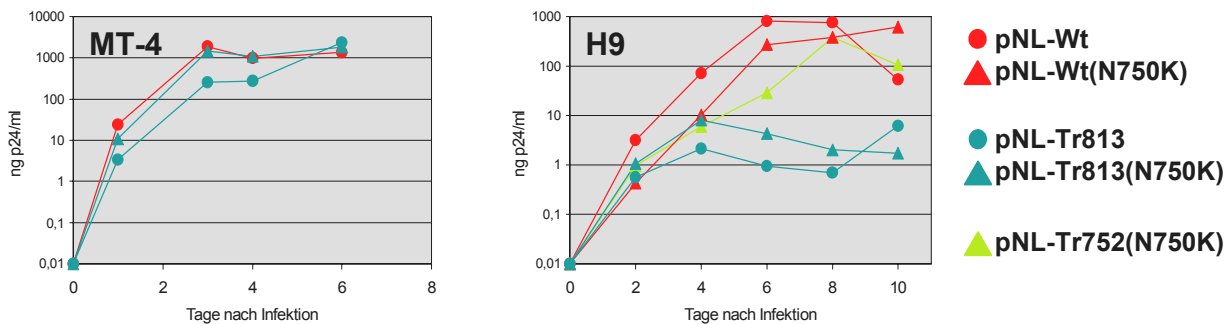


Abb. 4.17: Replikationskinetiken von pNL-Tr813(N750K) in MT-4- und H9-Zellen.

Gezeigt sind - wie angegeben - Replikationsverläufe von pNL-Wt, pNL-Wt(N750K), pNL-Tr752(N750K), pNL-Tr813 und pNL-Tr813(N750K). Je 10^6 MT-4- bzw. H9-Zellen wurden mit gleichen Mengen ($0,1 \mu\text{g}$ p24) aus transient transfizierten 293T-Zellen gewonnenem und bei -70°C gelagertem Virusüberstand infiziert, 5 Stunden nach Infektion gewaschen und in 2 ml RPMI^k-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage mit frischem Medium versehen und die Virusreplikation mittels Quantifizierung der Menge der in den Kulturüberstand neu freigesetzten Virionen verfolgt (p24-ELISA).

Die Kinetiken zeigen, daß pNL-Tr813(N750K) in MT-4-Zellen genauso schnell replizieren konnte wie pNL-Wt, während pNL-Tr813 wie in 4.2 beschrieben einen etwas verzögerten Phänotyp aufwies. In H9-Zellen zeigte pNL-Tr813(N750K) zwar im Vergleich zu pNL-Tr813 ein leicht beschleunigtes Replikationsverhalten, konnte aber die H9-Kultur nicht komplett infizieren. pNL-Tr752(N750K) konnte wie erwartet in H9-Zellen replizieren, allerdings etwas verzögert im Vergleich zu pNL-Wt.

Weiterhin ist zu sehen, daß pNL-Tr813 ab Tag 8 der Infektion in H9-Zellen ein beschleunigtes Replikationsverhalten aufwies. Durch Sequenzieren der proviralen DNA dieser Zellen (siehe 3.2.11 und 3.2.12.1) wurde bestätigt, daß das Stopkodon an Position 814 revertiert ist, so daß wieder ein Env-Protein voller Länge synthetisiert wurde. Das Env-Protein von pNL-Tr813(N750K) lag an Tag 8 der Infektionskinetik dagegen immer noch in verkürzter Form vor.

Dieses Experiment zeigt somit, daß die Replikationsgeschwindigkeit von pNL-Tr813 durch die eingeführte N750K-Mutation sowohl in MT-4- als auch in H9-Zellen erhöht wurde, allerdings kam es in H9-Zellen nicht zu einer kompletten Infektion der Kultur.

In den folgenden Experimenten sollte nun die Frage untersucht werden, was die Basis des Zelltyp-abhängigen Defekt der verschiedenen pNL-Derivate ist und wie die N750K-Mutation in pNL-Tr752(N750K) diesen Defekt überwinden kann.

4.4 Einbau von HIV-1-Env in Virionen

Wie in der Einleitung schon erwähnt, wurde in mehreren Veröffentlichungen berichtet, daß gewisse trunkierte Env-Proteine nicht in Virionen eingebaut werden, die aus nicht-permissiven Zellen freigesetzt werden, was zur Erklärung des defekten Phänotyps herangezogen wurde (Akari *et al.*, 2000; Murakami und Freed, 2000a).

Daher wurde im Rahmen der Arbeit untersucht, ob die hier untersuchten Virusmutanten mit trunkierten oder transmembranal mutierten Env-Proteinen einen Defekt im Glykoprotein-Einbau bei Freisetzung aus H9-Zellen aufweisen.

4.4.1 Einbau in pNL-Tr752- und pNL-Tr752(N750K)-Virionen

Zunächst war es von Interesse zu untersuchen, ob trunkiertes Env in von H9-Zellen freigesetzte pNL-Tr752-Viruspartikel eingebaut wird, und ob bzw. wie sich der Glykoproteineinbau in pNL-Tr752(N750K)-Viruspartikel davon unterscheidet. Bei Bestätigung der eben erwähnten Theorie würde man in aus H9-Zellen freigesetzten pNL-Tr752-Viruspartikeln einen defekten Env-Einbau erwarten, während in pNL-Tr752(N750K)-Viruspartikel Env-Proteine eingebaut werden sollten. Der Glykoprotein-Einbau wurde außerdem im Vergleich dazu in aus MT-4-Zellen freigesetzten Virionen untersucht, in denen aufgrund der vorhandenen Replikationskompetenz Env-Einbau zu erwarten ist. Der Versuchsablauf zur Gewinnung von Virionen aus MT-4- bzw. H9-Zellen ist in Abb. 4.18 dargestellt und wird im folgenden erläutert.

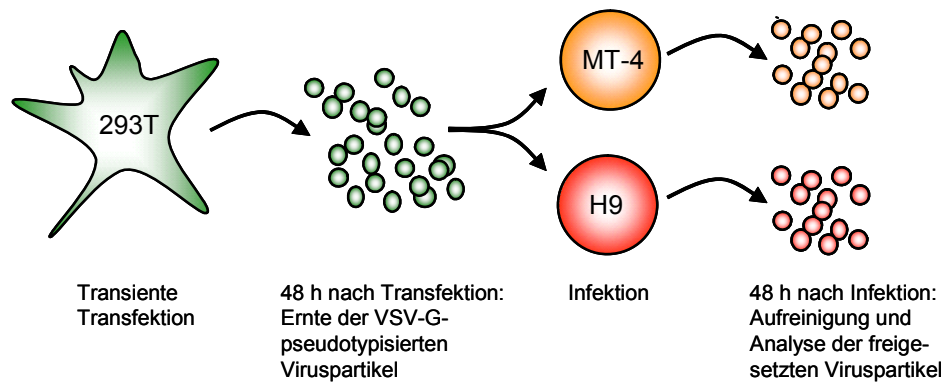


Abb. 4.18: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Untersuchung des Einbaus von Env-Proteinen in Viruspartikel aus MT-4- und H9-Zellen.

Detaillierte Erläuterungen sind im Text und in Kapitel 3.4.2 zu finden.

Um gut analysierbare Mengen an Viruspartikeln aus MT-4- und H9-Zellen zu erhalten, wurden für die Infektion von H9- und MT-4-Zellen auf p24 abgeglichene Mengen VSV-G pseudotypisierter Virionen benutzt, die durch transiente Transfektion mit den entsprechenden Expressionsplasmiden in 293T-Zellen gewonnen wurden (siehe 3.3.3). Aufgrund des erweiterten Wirtsspektrums der pseudotypisierten HIV-1-Virionen wurden aus Sicherheitsgründen teilweise provirale Expressionsplasmide verwendet, die für ein defektes Vpr-Protein kodieren. Vpr ist bei allen Lentiviren hochkonserviert und wird für die Etablierung einer HIV-1-Infektion *in vivo* absolut benötigt (Emermann, 1996; Planelles *et al.*, 1996). Der *vpr*-Leserahmen wurde durch Auffüllen der darin enthaltenen *EcoRI*-Schnittstelle (Nukleotid-Position 5743, pNL4-3-Nummerierung) verändert (siehe 3.2.5 und 3.2.7), dadurch wird ab Aminosäureposition 64 ein fehlerhaftes Vpr-Protein synthetisiert, welches schließlich nur 79 statt der ursprünglichen 96 Aminosäuren besitzt.

Fünf Stunden nach Infektion von ca. 3×10^6 MT-4- oder H9-Zellen wurden überschüssige Virionen durch mehrmaliges Waschen in RPMI^k-Medium entfernt, und die Zellen für weitere 43 Stunden für die Virusproduktion bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit waren dem Medium Reagenzien beigesetzt, welche Env-vermittelte Membranfusion und somit Zytotoxizität verhindern sollten (mo- α -CD4, 1 μ g/ml oder der CXCR4-Korezeptor-Antagonist AMD3100, 1 μ g/ml). Dies ist wichtig, weil auftretende Zytotoxizität möglicherweise zu der Freisetzung von Zelldebris und Membranvesikeln ins Medium führt. Diese könnten dann die Virionenpräparationen kontaminieren und zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen. Nach dieser Inkubationszeit wurde der virushaltige Zellkulturüberstand filtriert (\varnothing 0,45 μ m) und durch ein 20%-iges Saccharosekissen ultrazentrifugiert (siehe 3.3.4).

Wichtig ist es, hier zu erwähnen, daß die Menge aus MT-4- oder H9-Zellen freigesetzter mutanter Viruspartikel stets ähnlich der Menge freigesetzter pNL-Wt-Partikel war, was darauf

hindeutet, daß kein Defekt der Virusmutanten auf der Ebene des Virionenzusammenbaus oder der Virusfreisetzung vorliegt.

Danach wurden die Viren pellets in 100 µl 1% Triton X-100 in PBS lysiert (siehe 3.5.6), von diesem Lysat wurden dann auf p24-abgegliche Mengen nach SDS-PAGE in Western Blot-Analysen untersucht (siehe 3.5.3 und 3.5.4). Abb. 4.19 zeigt Western-Blot-Analysen aufgereinigter und lysierter Viruspartikel aus MT-4- und H9-Zellen sowie der Lysate von MT-4- und H9-Zellen, aus denen diese Partikel freigesetzt wurden.

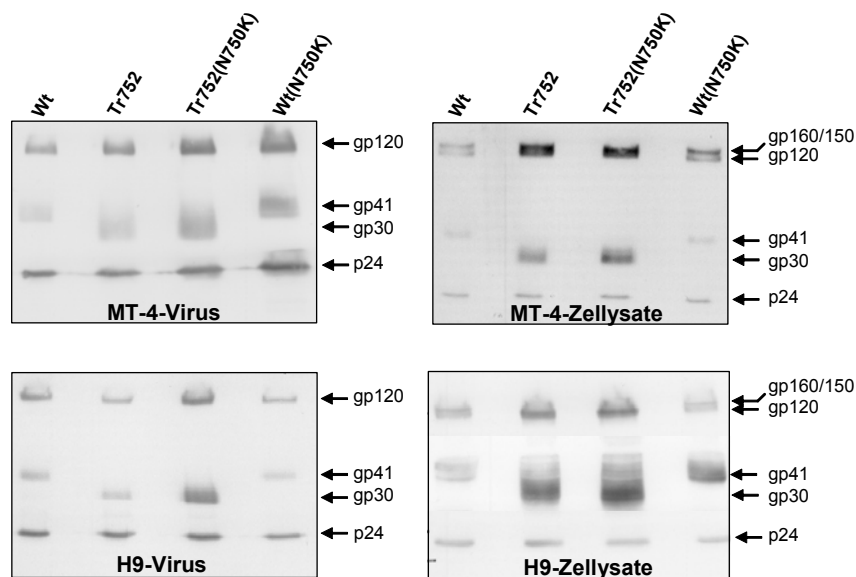


Abb. 4.19: Env-Einbau in pNL-Wt-, pNL-Tr752-, Tr752(N750K)- und pNL-Wt(N750K)-Viruspartikel, die aus MT-4- und H9-Zellen freigesetzt wurden.

Gezeigt sind Western-Blot-Analysen aufgereinigter und lysierter Viruspartikel, welche aus MT-4- und H9-Zellen freigesetzt wurden, sowie der Lysate der infizierten partikelfreisetzenden MT-4- und H9-Zellen nach SDS-PAGE. Die Präparation der Partikel ist in 3.4.2 detailliert beschrieben. Es wurden jeweils vergleichbare Viruspartikel- und Lysatmengen (per p24-ELISA ermittelt) analysiert. Der obere Teil der Blots wurde mit rb- α -gp120 gefärbt, der mittlere mit Chessie 8 gegen gp41 und der untere mit Mab183 gegen p24. Die Detektion sämtlicher Proteine erfolgte mit POX-gekoppelten Zweitantikörpern und ECL. Die detektierten Proteine sind am jeweiligen rechten Bildrand angegeben.

Innerhalb dieses Einbauversuchs wurden pNL-Wt, pNL-Tr752, pNL-Tr752(N750K) und pNL-Wt(N750K) untersucht. Wie man in Abb. 4.19 sehen kann, wurden sowohl gp120 als auch gp41 bzw. gp30 in sämtliche Virionen eingebaut, und zwar unabhängig davon, ob sie in H9-Zellen oder in MT-4-Zellen produziert wurden. Die relativen Mengen an Env, welche in Partikel eingebaut wurden, bewegten sich hierbei bei allen untersuchten Virusmutanten im selben Größenbereich, wobei der Env-Einbau in pNL-Tr752(N750K)-Partikel reproduzierbar leicht erhöht war im Gegensatz zu pNL-Wt und den anderen untersuchten Mutanten. Dieser leicht erhöhte Einbau war besonders für gp30 offensichtlich.

Betrachtet man die Env-Expression in MT-4- bzw. H9-Zellysaten, kann man feststellen, daß die Env-Expression von pNL-Tr752 und pNL-Tr752(N750K) in beiden Zelltypen erhöht war im Vergleich zu den Env-Proteinen voller Länge von pNL-Wt und pNL-Wt(N750K). Diese Beobachtung ist wiederum offensichtlicher für gp30 als für gp120.

4.4.2 Einbau in pNL-Tr712-Virionen und in Virionen der übrigen pNL-Derivate

Wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt wurde, scheint der Defekt von pNL-Tr752 hinsichtlich der Replikationskompetenz in nicht-permissiven Zellen nicht in einem defekten fehlenden Einbau des trunkierten Glykoproteins zu liegen. In diesem Zusammenhang war es nun von großem Interesse zu untersuchen, ob sich diese Beobachtung auf die anderen Virusmutanten mit trunkierten oder transmembranal mutierten Env-Proteinen übertragen läßt. Hierbei wurde zunächst das Hauptaugenmerk auf den Env-Einbau in pNL-Tr712-Virionen aus H9-Zellen gerichtet, da am Beispiel von pNL-Tr712 postuliert wurde, daß der fehlende Env-Einbau Ursache für den defekten Phänotyp von Virusmutanten mit Trunkationen in Env-CT sei (Akari *et al.*, 2000; Murakami und Freed, 2000a).

Für den Einbauversuch von Env in pNL-Tr712-Virionen wurden H9-Zellen wie in 3.4.2 und 4.4.1 beschrieben mit in 293T-Zellen produzierten VSV-G-pseudotypisierten pNL-Wt- und pNL-Tr712-Virionen infiziert und die freigesetzten Viruspartikel 48 Stunden nach Infektion gesammelt und analysiert. Abb. 4.20 zeigt Western Blot-Analysen der in H9-Zellen exprimierten und der in aus diesen Zellen freigesetzten Virionen eingebauten Env-Proteine.

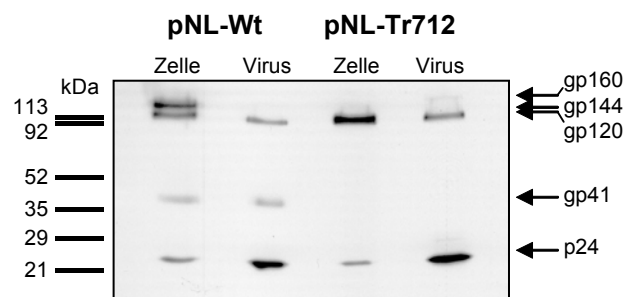


Abb. 4.20: Env-Einbau in aus H9-Zellen freigesetzte pNL-Wt- und pNL-Tr712-Virionen.

Gezeigt sind repräsentative Western-Blot-Analysen der Lysate infizierter H9-Zellen und der aus diesen Zellen freigesetzten aufgereinigten Viruspartikel nach SDS-PAGE. Die Präparation der Partikel ist in 3.4.2 detailliert beschrieben. Sowohl von Zellysaten als auch von Viruspartikeln wurden vergleichbare Mengen (per p24-ELISA ermittelt) analysiert. Der obere Teil der Blots wurde mit rb- α -gp120 gefärbt, der mittlere mit Chessie 8 gegen gp41 und der untere mit Mab183 gegen p24. Die Detektion sämtlicher Proteine erfolgte mit POX-gekoppelten Zweitantikörpern und ECL. Die detektierten Proteine sind am rechten Rand der Abbildung bezeichnet.

Das Ergebnis der Analyse zeigt, daß Env sowohl in pNL-Wt-Virionen als auch in pNL-Tr712-Virionen eingebaut wurde, und zwar konnte gp120 in relativ gleich großen Mengen in beiden Partikeltypen nachgewiesen werden. Der Nachweis des trunkierten Env-Proteins von pNL-Tr712 (gp25) war mit dem hier verwendeten gp41-Antikörper nicht möglich, da das Epitop für den monoklonalen Antikörper mit der Einführung des frühzeitigen Stop-Kodons auf Proteinebene entfernt wurde. Die Abbildung zeigt sehr deutlich, daß in Partikel nur gp120 eingebaut wurde und kein gp160 (pNL-Wt) bzw. gp144 (pNL-Tr712), was gegen eine signifikante Verunreinigung der Partikelpräparationen durch von Zellen freigesetzte Membranvesikel oder Zelldebris spricht. Dagegen kann die Expression von gp160 bzw. gp144 deutlich in den Zellysaten detektiert werden. Im Fall des pNL-Tr712-Zellysats laufen die beiden Banden von gp144 und gp120 in unmittelbarer direkter Nähe, so daß man keine zwei distinkten Banden erkennen kann.

Somit scheint auch im Falle von pNL-Tr712 der defekte Phänotyp in H9-Zellen nicht von einem defekten Glykoproteineinbau herzurühren, was einen Widerspruch zu eingangs erwähnten veröffentlichten Arbeiten darstellt.

Auch für die anderen im Rahmen der Arbeit untersuchten Virusmutanten konnte nicht gezeigt werden, daß der defekte Phänotyp in H9-Zellen in einem Glykoproteineinbaufekt begründet ist, sämtliche mutierten Env-Proteine werden in pNL-Tr813-, pNL-TmR-I- sowie pNL-TmCD22-Viruspartikel eingebaut, und zwar in ähnlichem Maße wie Env-Wt in pNL-Wt-Viruspartikel. Diese Aussage stützt sich auf die in Abb. 4.21 dargestellten Ergebnisse.

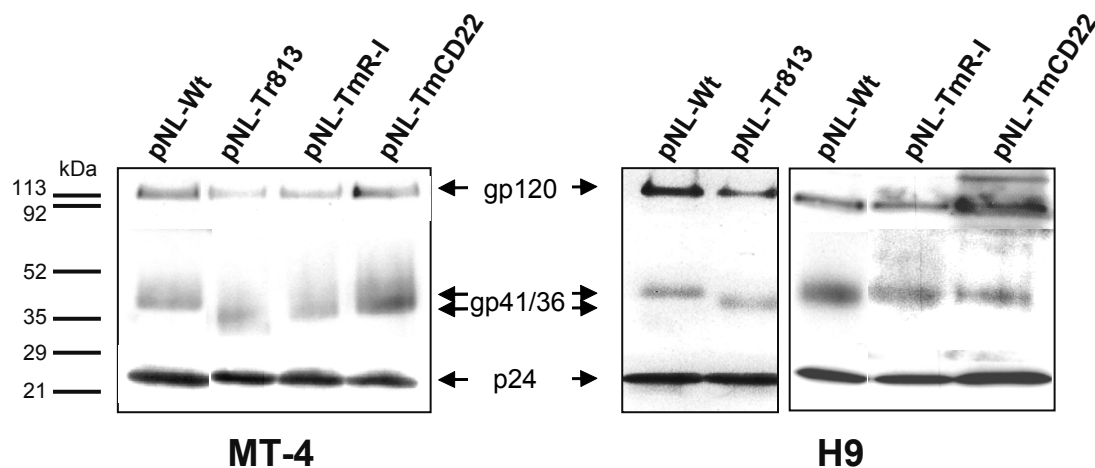


Abb. 4.21: Env-Einbau in aus MT-4- und H9-Zellen freigesetzte pNL-Wt-, pNL-Tr813, pNL-TmR-I- und pNL-TmCD22-Virionen.

Gezeigt sind repräsentative Western-Blot-Analysen aus MT-4- und H9-Zellen freigesetzter Virionen nach SDS-PAGE. Die Präparation der Partikel ist in 3.4.2 detailliert beschrieben. Sowohl von Zellysaten als auch von Viruspartikeln wurden gleiche Mengen von p24 (per ELISA ermittelt) analysiert. Der obere Teil der Blots wurde mit rb- α -gp120 gefärbt, der mittlere mit Chessie 8 gegen gp41 und der untere mit Mab183 gegen p24. Die Detektion sämtlicher Proteine erfolgte mit POX-gekoppelten Zweitantikörpern und ECL. Die detektierten Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

4.5 Untersuchungen zur Funktionalität der mutierten Env-Proteine

Wie im vorigen Kapitel beschrieben, wurde ein Glykoproteineinbau-Defekt als Ursache für den replikationsinkompetenten Phänotyp der Virusmutanten mit trunkierten und transmembranal mutierten Env-Proteinen in H9-Zellen ausgeschlossen werden. Daher wurde untersucht, ob die mutierten Env-Proteine in H9-Zellen im Gegensatz zu MT-4-Zellen in einer defekten Weise exprimiert werden, so daß sie keine Membranfusion nach Bindung an Rezeptor und Korezeptor vermitteln können. Im Gegensatz zu sonstigen Arbeiten, in denen Zell-Zell-Fusion nach transienter Transfektion von Expressionsplasmiden für die jeweiligen mutierten Env-Proteine in irrelevanten Zellen gemessen wurde (Spies und Compans, 1994; Edwards *et al.*, 2002), fand die Analyse der Fusionskapazität der mutierten Env-Proteine im Rahmen dieser Arbeit in relevanten MT4- und H9-Zellen statt.

4.5.1 Semi-quantitative Zell-Zell-Fusion

In einem semi-quantitativen Zell-Zell-Fusions-Versuch wurden die mutierten Env-Proteine im Rahmen einer VSV-G-vermittelten Infektion in MT-4- bzw. H9-Zellen exprimiert. 5 Stunden nach Infektion (siehe 3.4.2) wurden die Zellen zum Entfernen der für die Infektion benutzten Virionen gewaschen und für weitere 43 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte wie in 3.3.6 beschrieben für weitere 4 Stunden die Kokultivierung mit 1G5-Zellen, welche Jurkat-Zellen sind, die ein stabil integriertes Luziferase-Gen unter der Kontrolle des HIV-LTRs besitzen. Nur bei erfolgreicher Env-vermittelter Synzytium-Formation zwischen infizierten Zellen mit 1G5-Zellen kann das im Rahmen der Infektion in MT-4- bzw. H9-Zellen exprimierte virale Tat-Protein den LTR aktivieren, was dann zu einer messbaren Expression des Luziferase-Gens führt. Die Stärke der gemessenen Luziferase-Aktivität (siehe 3.5.9) kann dann als Maß für die Fusionskapazität der verschiedenen Env-Proteine herangezogen werden. Als Hintergrund-Wert, der von den gemessenen Werten subtrahiert wurde, diente ein Ansatz von mit pNL-Wt-infizierten MT-4- bzw. H9-Zellen inkubierten 1G5-Zellen, dem ein monoklonaler CD4-Antikörper (mo- α -CD4, 1 μ g/ml) beigegeben war. Dieser sollte die Bindung von Env an CD4 verhindern. Der hier gemessene Hintergrundwert stellte somit ein Maß dar für die unspezifische Fusion der infizierten T-Zellen mit 1G5-Zellen bzw. für eine mögliche Transaktivierung durch von den infizierten Zellen ins Medium freigesetzte Tat. Die hier gemessenen Werte waren stets niedrig im Vergleich zu den ohne CD4-Antikörper analysierten Ansätzen und lagen nur leicht erhöht über den Werten, die mit 1G5-Zellen *alleine* gemessen wurden.

Um ausschließlich Zell-Zell-Fusion zu messen und nicht das Ergebnis neuer Infektionsvorgänge, erfolgten sämtliche Inkubationszeiten in Anwesenheit des HIV-Proteaseinhibitors Saquinavir (1,5 μ M). Um schließlich auf mögliche Unterschiede in der VSV-G-vermittelten Infektion abzugleichen, wurde ein paralleler Ansatz *ohne* Proteaseinhibitor mitgeführt und die Höhe der viralen Genexpression mittels Messung der p24-Konzentration im Zellkulturüberstand (p24-ELISA, siehe 3.5.7) bestimmt. Abbildung 4.22 zeigt die Fusionskapazitäten der verschiedenen Env-Mutanten relativ zueinander.

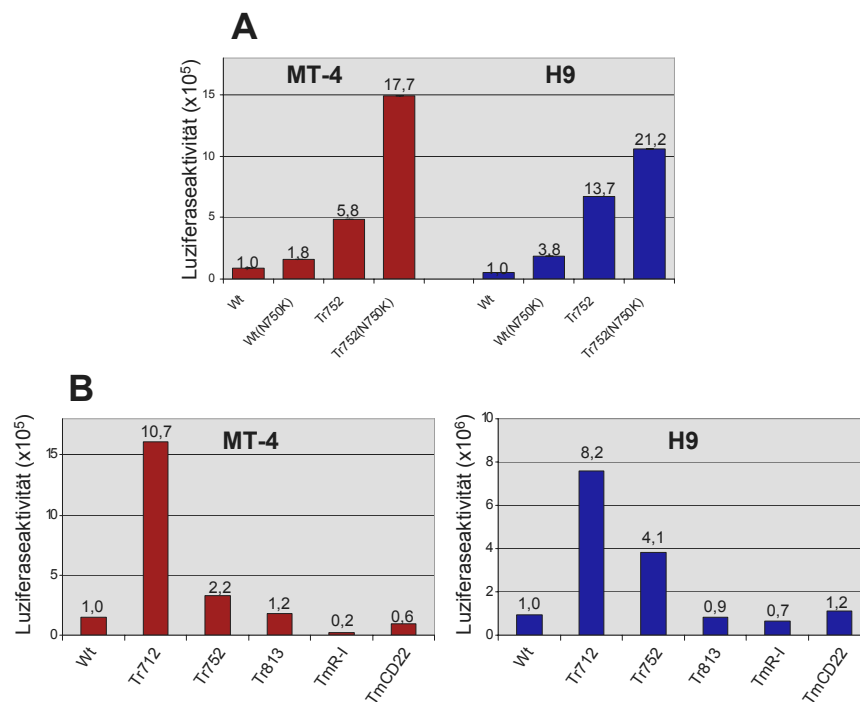


Abb. 4.22: Fusogenität der mutierten Env-Proteine nach Expression in MT-4- und H9-Zellen.

A. bzw. **B.** zeigen jeweils ein repräsentatives Ergebnis von jeweils insgesamt zwei durchgeführten Analysen. **A.** Vergleich der Fusogenität von Env-Wt und Env-Tr752, jeweils +/- N750K-Mutation. **B.** Vergleich der Fusogenität von Env-Wt und den in 4.1. beschriebenen Env-Proteinen mit Mutationen in Env-CT bzw. Env-TMD. Für die Expression der jeweiligen Env-Proteine in MT-4- und H9-Zellen wurden die Zellen wie in 3.4.2 beschrieben mit VSV-G-pseudotypisierten Viruspartikeln infiziert, 5 Stunden nach Infektion gewaschen und in frischem RPMI^K-Medium aufgenommen. Nach 48-stündiger Inkubation in Anwesenheit des HIV-1-Proteaseinhibitors Saquinavir (1,5 μ M) wurden die Zellen mit 1 ml konfluenten 1G5-Zellen (LTR-Luziferase) gemischt, vier Stunden inkubiert und anschließend lysiert (siehe 3.3.6 und 3.5.9). Anschließend erfolgte die Messung der Luziferaseaktivität im Lysat. Der Abgleich der erhaltenen Werte erfolgte anhand der p24-Konzentrationen in den Kulturüberständen infizierter Zellen eines parallelen Versuchsansatzes, welcher *ohne* Proteaseinhibitor durchgeführt wurde. Die Luziferase-Werte für pNL-Wt wurden gleich 1 gesetzt und so die relativen Werte der anderen Mutanten berechnet, die über den jeweiligen Balken angegeben sind.

In Teil A der Abbildung wurde zunächst die Fusionskapazität von pNL-Wt und pNL-Tr752 analysiert, jeweils auch im Kontext der N750K-Mutation (siehe 4.3.2). Wie man sehen kann, war die Fusionskapazität von Env-Wt(N750K) leicht erhöht im Vergleich zu Env-Wt (2-4 mal),

noch erhöhter war die Fusogenität von Env-Tr752 (6-14 mal) und am höchsten war die Fusogenität von Env-Tr752(N750K) (18-21 mal). Diese Beobachtung ist unabhängig davon, ob die entsprechenden Env-Proteine in MT-4- oder in H9-Zellen exprimiert wurden. Dies zeigt, daß diese mutierten Env-Proteine keinen Fusionsdefekt in H9-Zellen aufweisen, und daß ihre Fusogenität nicht mit der Replikationskompetenz der Virusmutanten korreliert: in nicht-permissiven H9-Zellen können sowohl pNL-Wt (mit der niedrigsten Env-Fusionskapazität) als auch pNL-Tr752(N750K) (mit der höchsten Env-Fusionskapazität) replizieren, während pNL-Tr752 (mit einer intermediären Env-Fusionskapazität) dazu nicht in der Lage ist.

Abb. 4.22 B zeigt das Ergebnis des semi-quantitativen Zell-Zell-Fusions-Versuches für die anderen untersuchten Env-Proteine. Auch hier läßt sich die Beobachtung machen, daß keines der mutierten Proteine einen Fusionsdefekt in H9-Zellen aufwies, alle gemessenen Luziferaseaktivitäts-Werte für den Versuch mit infizierten H9-Zellen besitzen ähnliche Werte wie in dem Versuchsansatz mit MT-4-Zellen. Weiterhin zeigen die Daten, daß Env-Tr712 in beiden Zelltypen eine deutlich erhöhte Fusionskapazität gegenüber Env-Wt besaß, was mit schon publizierten Daten übereinstimmt (Wilk et al., 1992). Auch Env-Tr752 wies eine erhöhte Fusionskapazität auf, allerdings war dieses Phänomen hier nicht so deutlich ausgeprägt wie innerhalb des Datensatzes, der in Abb. 4.22 A dargestellt ist. Env-Tr813 sowie die beiden Env-Proteine mit Mutationen in Env-TMD wiesen dagegen keine gesteigerte Fusionskapazität auf.

Der defekte Phänotyp der Virusmutanten mit trunkierten Env-Proteinen bzw. von pNL-TmCD22 in H9-Zellen scheint somit nicht auf mangelnde Fusionskapazität der mutierten Env-Proteine zurückzuführen zu sein.

4.5.2 CD4-Unabhängigkeit von pNL-Tr752(N750K)

Eine auffallende Beobachtung der Versuche, welche im vorigen Abschnitt beschrieben sind, ist die gegenüber Env-Wt deutlich erhöhte Fusionskapazität von Env-Tr752(N750K). Eine strukturelle Interdependenz zwischen der Länge der zytoplasmatischen Domäne von gp41 und der Ektodomäne des Env-Proteins im Sinne einer erhöhten Exposition der Korezeptor-Bindestelle von gp120 und einer erhöhten Sensitivität gegenüber neutralisierenden Antikörpern wurde 2002 von Edwards *et al.* berichtet. Deswegen wurde untersucht, ob Env-Tr752 durch Insertion der N750K-Mutation möglicherweise CD4-unabhängig geworden und deswegen jetzt in H9-Zellen replikationsfähig ist.

Dafür wurden Infektionsversuche in TZM-bl-Zellen durchgeführt. Diese Zelllinie besitzt stabil integriert sowohl ein β -Galaktosidase- als auch ein Luziferase-Gen, jeweils unter der

Kontrolle des HIV-LTRs. Bei einer erfolgreichen Infektion der Zelle wird der LTR durch das im Rahmen der Infektion exprimierte virale Tat-Protein aktiviert, und es kommt zu einer Expression der beiden Gene. Innerhalb dieses Versuches wurde nur die Luziferaseaktivität gemessen.

Jeweils ca. 10^6 TZM-bl-Zellen, welche in einer 12-Loch-Platten-Vertiefung ausplattiert waren, wurden eine Stunde vor Infektion folgendermaßen behandelt: das alte Medium wurde entfernt und durch Medium ersetzt, welches zu 50% Hybridomüberstände von Zellen enthielt, welche Antikörper gegen CD4 (SIM.2/SIM.4) bzw. als Kontrolle Antikörper gegen ein irrelevantes Protein (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) produzieren. Dann wurden die Zellen mit in MT-4- bzw. H9-Viren produzierten Virionen (siehe 3.4.2, normalisiert auf 200 ng p24) infiziert, für 24 Stunden inkubiert, in Luziferase-Lysepuffer lysiert und die Luziferaseaktivität im Luminometer gemessen (siehe 3.5.9). Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 4.23 dargestellt.

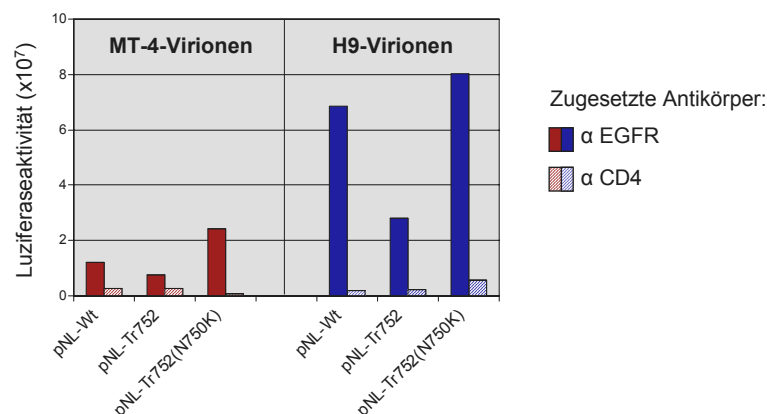


Abb. 4.23: Versuch zur Überprüfung der CD4-Abhängigkeit von pNL-Tr752(N750K).

Jeweils ca. 10^6 TZM-bl-Zellen (LTR-Luziferase) wurden mit den am unteren Teil der Abbildung bezeichneten in MT-4- und H9-Zellen produzierten Virionen (abgeglichen auf 200 ng p24) infiziert. Die Infektionen wurden entweder wie in der Legende angegeben in Anwesenheit von EGFR- oder CD4-Antikörpern (SIM.2/SIM.4) für 24 Stunden inkubiert, daraufhin erfolgte die Lyse der Zellen in Luziferase-Lysepuffer und die Messung der Luziferaseaktivität in den Lysaten (siehe 3.5.9).

Die Daten zeigen, daß bei Env-Tr752(N750K) keine CD4-Unabhängigkeit vorliegt. Die Infektionen wurden genauso wie die pNL-Wt-Infektionen in Anwesenheit der blockierenden CD4-Antikörper inhibiert.

Auffällig in dieser Analyse ist, welche neben dem Einfluß von CD4-Antikörpern auf die Infektiosität der einzelnen Virusmutanten auch die Infektiosität der Virusmutanten in einer einzelnen Replikationsrunde quantifiziert, daß zellfreies pNL-Tr752 zwar weniger infektiös war als pNL-Wt, aber daß diese Reduzierung der Infektiosität nur verhältnismäßig gering war

und sowohl bei Virionen aus MT-4-Zellen *und* H9-Zellen auftrat. Diese Beobachtung wird in mehreren Versuchsreihen in 4.6 aufgegriffen und näher untersucht.

4.5.3 Oberflächenexpression der mutierten Env-Proteine in infizierten H9-Zellen

Ein anderer Faktor, welcher auf die im Zell-Zell-Fusionsversuch gemessenen Werte Einfluß haben kann, ist das Maß der Oberflächenexpression der verschiedenen Env-Proteine. Um diesen Aspekt zu untersuchen, wurden Oberflächenbiotinylierungen infizierter H9-Zellen durchgeführt.

Dazu wurden die Zellen wie in 3.4.2 beschrieben mit in 293T-Zellen produzierten VSV-G-pseudotypisierten pNL-Wt-Partikeln und Derivaten davon infiziert. 48 Stunden nach Infektion erfolgte dann die Biotinylierung der Zellen wie in 3.5.10 detailliert beschrieben, hierbei wurden alle Prozeduren auf Eis durchgeführt. Nach einmaligem Waschen in PBS wurden die Zellen für eine halbe Stunde in einer NHS-Biotin-haltigen PBS-Lösung inkubiert, gewaschen und anschließend in einem Glyzin-haltigem Puffer aufgenommen, um überschüssiges Biotin zu blockieren. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 1% Triton X-100 in PBS lysiert und die biotinylierten Proteine aus abgeglichenen Mengen (p24-ELISA des Infektionsüberstandes) von Zelllysaten mit Streptavidin-gekoppelter Sepharose für 4 Stunden bei 4°C gefällt. Anschließend erfolgte die Analyse der gesamten Proteine der Zelllysate und der gefällten Oberflächenproteine im Western Blot, dargestellt in Abb. 4.24.

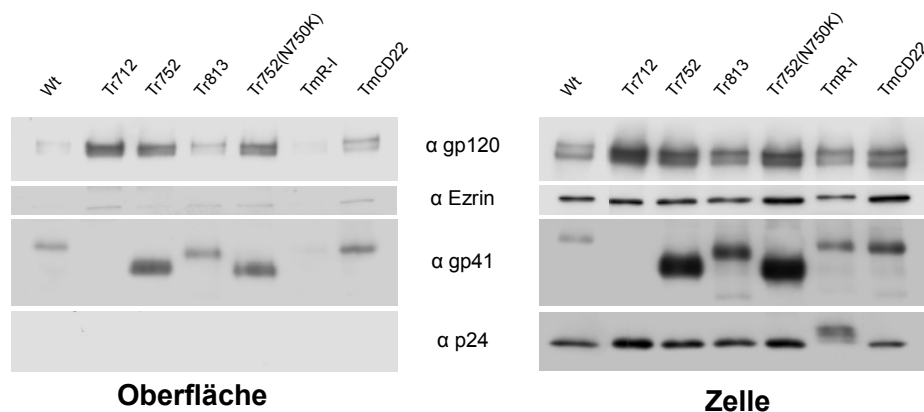


Abb. 4.24: Oberflächen-Expression von Env-Wt und Env-Mutanten in infizierten H9-Zellen.

H9-Zellen wurden mit VSV-G pseudotypisierten Virionen infiziert und 48 Stunden nach Infektion biotinyliert, gefolgt von einer Fällung der biotinylierten Oberflächenproteine mit Streptavidin-Sepharose (siehe 3.4.2 und 3.5.10). Auf p24 normalisierte Mengen der Proteine der Zelloberfläche bzw. des Gesamt-Zelllysats wurden anschließend im Western Blot analysiert. Der Auftrag der Proben erfolgte wie am oberen Rand der Abbildung bezeichnet. Der obere Teil der Blots wurde wie bezeichnet mit rb-α-gp120 gefärbt, der mittlere mit Chessie 8 gegen gp41 und der untere mit Mab183 gegen p24. Nach Färbung wurden die gebundenen Antikörper mit 0,2 M NaOH entfernt und mit mo-α-Ezrin gefärbt. Die Detektion sämtlicher Proteine erfolgte mit POX-gekoppelten Zweitantikörpern und ECL. Für die beiden Membranen sind jeweils gleiche Expositionen gezeigt.

Eine wichtige Kontrolle für die korrekte Durchführung des Experimentes war die Färbung der Membranen mit einem Antikörper gegen Ezrin, ein Protein des Zytoskeletts, welches nur intrazellulär vorliegt und somit nicht auf der Membran detektiert werden sollte, auf der die mit Streptavidin-Sepharose gefällten Oberflächenproteine analysiert wurden. Tatsächlich erschienen die Ezrin-Banden nur auf dem Blot, auf dem Gesamtzelllysate aufgetragen wurden, und es ist nur eine sehr schwache Ezrin-Bande in der Analyse der Oberflächenproteine zu sehen. Auch p24 stellte eine Art Negativkontrolle dar: es war ausschließlich in der Analyse der Gesamtzelllysate detektierbar. Die Stärke der p24-Banden in den Zelllysaten kontrollierte hierbei ebenfalls für den nach viraler Genexpression normalisierten Auftrag der Proben. In der Analyse der Oberflächenproteine dagegen war kein p24 zu erkennen, es liegt nur intrazellulär bzw. in mit Zellen assoziierten Virionen vor und wird nicht biotinyliert. Mit diesen Kontrollen wurde somit die korrekte Durchführung des Experiments bestätigt.

Zunächst läßt sich die Beobachtung machen, daß die Expression aller Env-Proteine an der Oberfläche relativ zueinander gesehen gleich war wie ihre Expression in der Zelle: die Intensitäten der Env-Banden auf beiden Membranen war relativ zueinander gleich. Hierbei wurde immer nur ein Anteil des in der gesamten Zelle exprimierten Env-Proteins an der Oberfläche exprimiert, da die Banden auf dem Blot der Gesamtzelllysate durchgehend immer stärker sind als die entsprechenden Banden auf dem Blot der Oberflächen-Proteine. Somit scheint die Höhe der Oberflächenexpression eine Konsequenz der Expression in der Zelle zu sein und die folgenden Aussagen hinsichtlich Expression können daher sowohl für die Zelloberfläche als auch für die gesamte Zelle gelten.

Es ist deutlich zu erkennen, daß die Expression der Env-Proteine mit großen Trunkationen (Env-Tr712, Env-Tr752 und Env-Tr752(N750K)) gegenüber Wt-Env signifikant erhöht war: die gp160-, gp120- und gp41-Banden - wobei hier die Env-Wt-Bezeichnungen auch für die trunkierten Formen der Proteine verwendet werden - sind in jedem Fall intensiver als die Banden von Env-Wt. Diese Beobachtung ist besonders für gp41 bzw. gp30 auffallend, was auch schon in den Env-Einbau-Studien offensichtlich wurde (siehe 4.4.1, Abb. 4.19). Hierbei muß beachtet werden, daß sich die trunkierte Form des gp41 (gp25) von pNL-Tr712 mit dem hier benutzten Antikörper (Chessie 8) nicht detektieren ließ. Im Gegensatz dazu ist für Env-Tr813, Env-TmR-I bzw. Env-TmCD22 keine erhöhte Expression zu beobachten, alle Banden ähneln hinsichtlich ihrer Intensität den Banden von Wt-Env.

Die hier erhaltenen Ergebnisse für die Höhe der Oberflächenexpression der verschiedenen Env-Proteine korrelieren grob mit den Ergebnissen, im Zell-Zell-Fusions-Versuch beobachtet wurden (siehe 4.5.1): während Env-Tr813, Env-TmR-I und Env-TmCD22 keine erhöhte Oberflächenexpression gegenüber Env-Wt zeigten und keine erhöhte Fusionskapazität

aufwiesen, wurden Env-Tr712, Env-Tr752 und Env-Tr752(N750K) deutlich erhöht gegenüber Env-Wt an der Oberfläche exprimiert und waren auch, insbesondere im Fall von Env-Tr712 und Env-Tr752(N750K), deutlich fusogener als Env-Wt.

4.6 Quantifizierung der Infektiosität der HIV-1-Mutanten

In 4.1 wurde die Replikation der verschiedenen Virusmutanten in MT-4 und H9-Zellen analysiert, wobei die Virusausbreitung in der Zellkultur die Summe von Infektionsvorgängen durch zellfreie Virionen als auch von Zell-Zell-Transmission von HIV darstellt. Da die in H9-Zellen replikationsinkompetenten Virusmutanten mit Trunkationen in Env-CT weder aufgrund eines Env-Glykoprotein-Einbaus (siehe 4.4). noch aufgrund mangelnder Fusionskapazität (siehe 4.5) defekt zu sein schienen, wurde untersucht, ob die in H9-Zellen gebildeten Virionen im Gegensatz zu in MT-4-Zellen gebildeten Virionen *per se* einen Defekt hinsichtlich ihrer Infektiosität aufweisen, und wenn ja, wie groß dieser Defekt ist.

Im hier durchgeführten Ansatz zur Beantwortung dieser essentiellen Frage wurde die Infektiosität zellfreier Virionen, welche sowohl aus MT-4- als auch aus H9-Zellen freigesetzt wurden, in einer *einzelnen* Replikationsrunde (*single round of infection*) quantifiziert. Die Analysen erfolgten ausschließlich mit der in H9-Zellen nicht replikationskompetenten Mutante pNL-Tr752 und deren replikationskompetenter Variante pNL-Tr752(N750K) im Vergleich zu pNL-Wt.

Für die hier beschriebenen Analysen wurden MT-4 und H9-Zellen wie in 3.4.2 mit in 293T-Zellen gewonnenen VSV-G pseudotypisierten Virionen infiziert und die Zellkulturüberstände 48-72 Stunden nach Infektion geerntet. Es erfolgte *keine* Aufreinigung und Konzentration der gewonnenen Viruspartikel, sondern direkt die Bestimmung der p24-Konzentration mittels ELISA (siehe 3.5.7) und der Einsatz der so erhaltenen Virionen in den verschiedenen Infektiositäts-Versuchen.

4.6.1 Infektiosität zellfreier Virionen aus MT-4- und H9-Zellen in TZM-bl-Zellen

Für die Messung der Infektiosität der verschiedenen Viruspartikel wurden zunächst TZM-bl-Zellen verwendet, die stabile Integrate des β -Galaktosidase- und des Luziferase-Gens unter der Kontrolle des HIV-LTRs besitzen. Für die Infektion wurden auf 200 ng p24 abgeglichene Virionen aus MT-4- und H9-Zellen wie in 3.4.4.1 beschrieben zu entweder je 10^6 TZM-bl-Zellen in einer Vertiefung einer 12-Loch-Platte (Analyse der Luziferase-Aktivität) oder in

serieller Verdünnung zu je 5×10^4 TZM-bl-Zellen in einer Vertiefung einer 96-Loch-Platte (Analyse der β -Galaktosidase-Aktivität) gegeben. 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen entweder für die Messung der Luziferaseaktivität lysiert (siehe 3.5.9) oder mit X-Gal gefärbt, gefolgt von einer Zählung blauer Zellen (siehe 3.5.8). Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abb. 4.25 dargestellt.

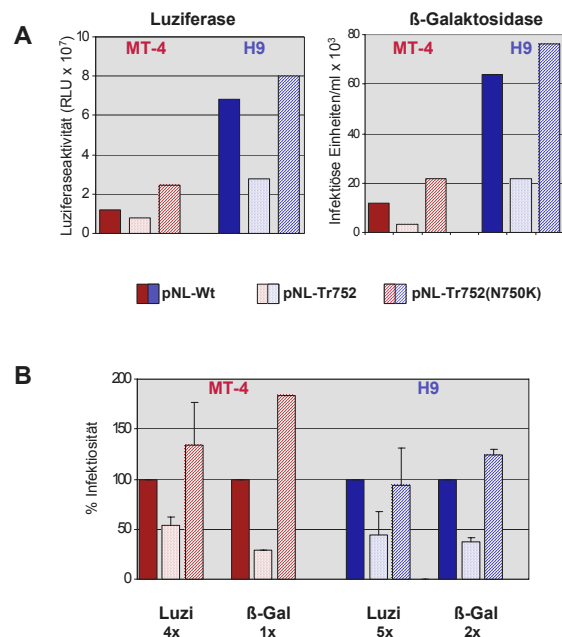


Abb. 4.25: Infektiosität von pNL-Wt, pNL-Tr752 und pNL-Tr752(N750K) in TZM-bl-Zellen.

TZM-bl-Zellen wurden mit auf 200 ng p24 abgeglichenen Mengen in MT-4- und H9-Zellen produzierter Virionen infiziert. 24 Stunden nach Infektion folgte die Lyse der Zellen und Messung der Luziferase-(Luzi) bzw. der β -Galaktosidase-Aktivität (β -Gal) (siehe 3.4.2, 3.5.8 und 3.5.9) **A**. Gezeigt sind repräsentative Auswertungen: links eine Messung der Luziferaseaktivität (angegeben sind RLU (*relative light units*)), rechts eine Messung der β -Galaktosidaseaktivität (angegeben sind infektiöse Einheiten/ml). **B**. Dargestellt sind die in mehreren Experimenten ermittelten relativen Infektiositäten von pNL-Tr752 und pNL-Tr752(N750K) im Vergleich zu pNL-Wt, dessen Wert auf 100% gesetzt wurde. Die Balken stellen jeweils den Mittelwert der in den einzelnen Experimenten erhaltenen Daten dar, der Fehlerbalken ergibt sich aus der Standardabweichung der Werte. Die Anzahl der für die jeweiligen Meßreihe durchgeführten Experimente ist unter dem jeweiligen Datensatz angegeben.

Im Vergleich zu pNL-Wt waren die für die Infektiosität der zellfreien pNL-Tr752-Virionen gemessenen Werte sowohl in der Luziferaseaktivitätsmessung als auch in der X-Gal-Färbung reduziert, aber nur in geringfügigem Maß (Abb. 4.25 A), was sich auch in den in mehreren Versuchen ermittelten Verhältnissen widerspiegelt (Abb 4.25 B). Durchschnittlich betrug die Infektiosität zellfreier pNL-Tr752-Virionen im Vergleich zu zellfreien pNL-Wt-Virionen in beiden Nachweisverfahren ca. 30-50%, und zwar unabhängig davon, ob die Virionen in MT-4- oder H9-Zellen produziert wurden.

Die Variante pNL-Tr752(N750K) wies im Gegensatz dazu überhaupt keine reduzierte, sondern tendentiell eher eine im Vergleich zu pNL-Wt erhöhte Infektiosität auf: in sämtlichen Experimenten wurde gezeigt, daß die Infektiosität von zellfreiem pNL-Tr752(N750K) mindestens genauso hoch war wie die Infektiosität von zellfreiem pNL-Wt, was wiederum sowohl für in MT-4-Zellen produzierte Virionen als auch für in H9-Zellen produzierte Virionen gilt.

Weiterhin zeigen die in Abb. 4.25 A repräsentativ dargestellten und auch die in allen anderen Versuchen erhaltenen Daten, daß sämtliche Virionen, welche in H9-Zellen produziert wurden, deutlich infektiöser waren als jeweils die gleiche Menge in MT-4-Zellen produzierter Virionen. Diese gesteigerte Infektiosität belief sich hier auf einen Faktor von ca. 3-8 für alle untersuchten Virionen in beiden Nachweisverfahren.

4.6.2 Infektiosität zellfreier Virionen aus MT-4- und H9-Zellen in T-Zellen

Um die im vorigen Kapitel erhaltenen Ergebnisse zu untermauern, wurden Infektiositäten von zellfreien pNL-Wt-, pNL-Tr752- und pNL-Tr752(N750K)-Virionen in einem relevanteren Zellsystem untersucht. Statt rekombinanter HeLa-Derivate wurden T-Zellen, in diesem Fall MT-4- und H9-Zellen, als Indikatorzellen verwendet.

4.6.2.1 Intrazelluläre FACS-Analysen infizierter T-Zellen

In diesem Versuchsansatz wurden intrazelluläre p24-FACS-Analysen von mit den verschiedenen zellfreien Virionen infizierten MT-4-Zellen 24 Stunden nach Infektion durchgeführt. Diese Analysen sollten ursprünglich auch FACS-Analysen infizierter H9-Zellen einschließen, jedoch war die Anzahl produktiv infizierter H9-Zellen stets zu gering, um ausgewertet zu werden, worauf in 4.7 näher eingegangen wird.

Für die FACS-Analysen wurden wie in 3.4.2 detailliert beschrieben 5×10^6 MT-4-Zellen mit in MT-4- und H9-Zellen produzierten Virionen infiziert und 5 Stunden nach Infektion ausgiebig gewaschen. Üblicherweise wurde für die Infektion von je 5×10^6 Zellen die Menge von auf 5 µg p24 abgeglichenen Virionen verwendet. 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen für drei Stunden mit 3% PFA in PBS fixiert und anschließend intrazellulär gefärbt. Hierfür wurde ein FITC-gekoppelter p24-Antikörper in einem Puffer verdünnt, der zur Permeabilisierung der Zellen 0,1% Triton X-100 enthielt. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Zellen im FACS-

Gerät vermessen (siehe 3.5.2). Die Ergebnisse der FACS-Analysen sind in Abb. 4.26 dargestellt.

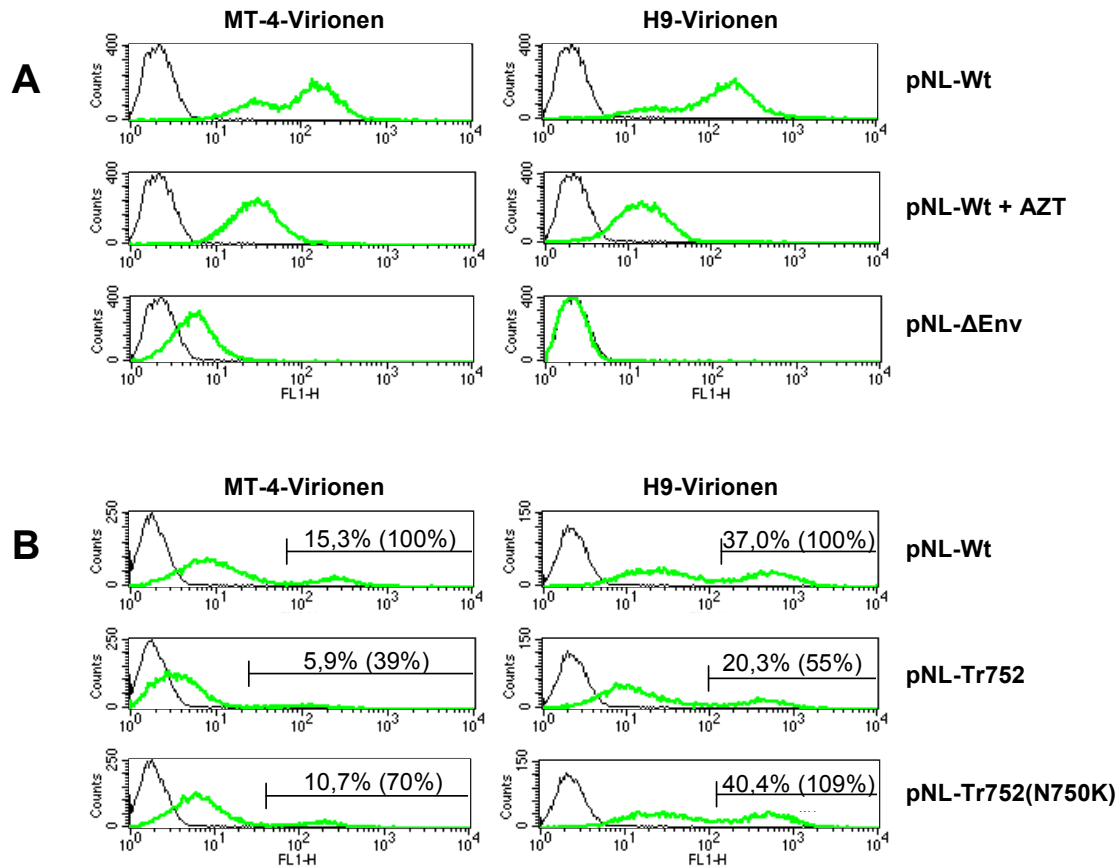


Abb. 4.26: FACS-Analyse der Infektiosität von zellfreien pNL-Wt-, pNL-Tr752- und pNL-Tr752(N750K)-Virionen in MT4-Zellen.

Für die Analysen wurden jeweils 5×10^6 MT-4-Zellen mit auf p24 abgeglichenen Mengen der jeweiligen Virionen infiziert (wenn angegeben in Anwesenheit von AZT). 24 Stunden nach Infektion erfolgte nach dreistündiger Fixierung der infizierten Zellen in 3% PFA in PBS die intrazelluläre p24-FACS-Färbung mit dem FITC-gekoppelten Antikörper KC57-FITC in einem permeabilisierenden Puffer und die Messung der Fluoreszenz der Zellen im FACS-Gerät. Die schwarze Kurve repräsentiert jeweils die Messung uninfectierter gefärbter Zellen, die grüne Kurve jeweils die Messung der infizierten gefärbten Zellen. Der Anteil der produktiv infizierten Zellen der Gesamtzellpopulation wurde durch Eingrenzung des jeweils zweiten stärker fluoreszierenden Gipfels ermittelt. Der hier erhaltene Wert wurde dann für die pNL-Wt-Infektion jeweils auf 100% gesetzt, um so die relativen Infektiositäten der anderen Virionen zu berechnen (in Klammern angegeben). **A.** Gezeigt sind Kontroll-Analysen von MT-4-Infektionen mit pNL-Wt-Virionen, pNL-Wt-Virionen in Anwesenheit von 50 μ M AZT und pNL-ΔEnv-Virionen, jeweils aus MT-4-Zellen (linke Seite) oder aus H9-Zellen (rechte Seite) stammend. Für die jeweiligen Infektionen wurden abgeglichene Virionen-Mengen von 1 μ g pro 10^6 MT-4-Zellen verwendet. **B.** Dargestellt sind Analysen der Infektiosität von pNL-Wt-, pNL-Tr752- und pNL-Tr752(N750K)-Virionen, jeweils aus MT-4-Zellen (linke Hälfte, 1 μ g p24-Einsatz des jeweiligen Virus pro 10^6 Zellen) oder aus H9-Zellen stammend (rechte Hälfte, 0,3 μ g p24-Einsatz des jeweiligen Virus pro 10^6 Zellen).

Abb. 4.26 A zeigt die p24-FACS-Analysen von mit pNL-Wt infizierten MT-4-Zellen in mehreren Kontrollexperimenten. Im Gegensatz zu uninfizierten Zellen kann man bei der Infektion mit pNL-Wt-Virionen, welche sowohl aus H9-Zellen als auch aus MT-4-Zellen stammen, beobachten, daß sich die gesamte infizierte MT-4-Population unter Entstehung zweier Gipfel verschiedener Fluoreszenzintensität nach rechts verschiebt. Die Präsenz von Azidothymidin (AZT) im Infektionsansatz hatte die Unterbindung der *de novo*-Synthese von p24 in den MT-4-Zellen zur Folge, was bei der Messung 24 Stunden nach Infektion die Bildung des zweiten, stärker fluoreszierenden Gipfels unterband. Sämtliche MT-4-Zellen befinden sich im ersten, schwächer fluoreszierenden Gipfel, welcher somit anzunehmenderweise MT-4-Zellen repräsentiert, die nicht produktiv infiziert, aber möglicherweise noch mit den für die Infektion verwendeten Virionen assoziiert waren, welche an den Zellen hafteten oder internalisiert wurden. Demnach repräsentiert der zweite, stärker fluoreszierende Gipfel, der in der pNL-Wt-Infektion *ohne* AZT beobachtet werden konnte, produktiv infizierte MT-4-Zellen.

Um zu klären, ob die unspezifische Assoziation mit Virus, welche die Bildung des ersten, schwächer fluoreszierenden Gipfels zur Folge hatte, ganz oder teilweise Glykoprotein-vermittelt war, wurden MT-4-Zellen mit defekten pNL- Δ Env-Virionen infiziert, welche aufgrund einer Leserasterverschiebung in *env* kein Glykoprotein exprimieren. In diesem Fall wurde in der p24-FACS-Analyse der so infizierten Zellen nur eine sehr schwache Verschiebung (bei Virionen aus MT-4-Zellen) bzw. gar keine Verschiebung (bei Virionen aus H9-Zellen) der Fluoreszenzintensität der infizierten Zellpopulation gegenüber der Fluoreszenzintensität der gefärbten, aber nicht infizierten Zellpopulation beobachtet. Somit liegt der Hauptanteil der möglichen Ursachen für eine Verschiebung des Fluoreszenzintensitäts-Gipfels bei einer Infektion von MT-4-Zellen mit pNL-Wt selbst in Anwesenheit von AZT in einer unspezifischen, Env-vermittelten Assoziation der Zellen mit Virionen.

Mit diesem Hintergrundwissen können nun die Messergebnisse betrachtet werden, die bei der Infektion von T-Zellen mit zellfreien pNL-Wt-, pNL-Tr752- und pNL-Tr752(N750K)-Virionen erhalten wurden (Abb. 4.26 B). Zellfreie pNL-Tr752-Virionen waren im Vergleich zu pNL-Wt-Virionen wie schon in 4.6.1 beobachtet wiederum nur geringfügig defekt: die zu pNL-Wt-Virionen relativen Infektiositäten betrugen 39% (MT-4-Virionen) bzw. 55% (H9-Virionen). Die Infektiositäten zellfreier pNL-Tr752(N750K)-Virionen waren dagegen im Vergleich zu pNL-Wt-Virionen nur geringfügig bzw. überhaupt nicht reduziert.

Auch die schon gemachte Beobachtung, daß H9-Virionen im allgemeinen infektiöser sind als die entsprechenden MT-4-Virionen, konnte wiederholt werden: obwohl für die Infektionen in Abb. 4.26 B ca. die dreifache Menge an MT-4-Virionen benutzt wurde wie für die Infektionen

mit H9-Virionen, wurden in den entsprechen Infektionen jeweils 2,4 - 3,8 mehr Zellen durch H9-Virionen infiziert als durch MT-4-Virionen.

4.6.2.2 Messung der p24-Freisetzung aus infizierten T-Zellen

Neben den in 4.6.2.1 beschriebenen p24-FACS-Analysen wurde parallel noch eine weitere Messung der Infektiositäten zellfreier MT-4- und H9-Virionen in einer *single round of infection* durchgeführt. Hierbei wurde 24 Stunden nach Infektion (siehe 4.6.2.1, verwendet wurde 1 µg p24 pro 10⁶ Zellen) die Freisetzung neu produzierter Virionen in den Zellkulturüberstand der infizierten T-Zellen mittels p24-ELISA (siehe 3.5.7) quantifiziert. Die Menge der innerhalb dieser 24 Stunden neu freigesetzten Virionen reflektiert die Infektiositäten der jeweils für die Infektion verwendeten Virionen. Die gemessenen Werte sind in Tab. 4.2 aufgeführt.

Tab. 4.2: De novo-Virusproduktion in MT-4- und H9-Zellen, welche mit verschiedenen zellfreien Virionen infiziert wurden.

		MT-4-Zellen	H9-Zellen
MT-4-Virionen	pNL-Wt	56,4 (100%)	2,6 ¹
	pNL-Tr752	28,9 (40%)	2,1 ¹
	pNL-Tr752(N750K)	32,3 (48%)	3,1 ¹
	pNL-ΔEnv	10,2 ¹	1,4 ¹
H9-Virionen	pNL-Wt	2838,8 (100%)	2,8 ¹
	pNL-Tr752	1148,2 (40%)	6,2 ¹
	pNL-Tr752(N750K)	4166,2 (147%)	12,5 ¹
	pNL-ΔEnv	- ²	5,1 ¹

Die Werte geben an, wieviel Virionen 24 Stunden nach Infektion in den Zellkulturüberstand abgegeben wurden (ng p24/ml). Die Werte in den Klammern geben die relativen p24-Werte der Virusmutanten zu pNL-Wt (100%) nach Abzug des Hintergrund-Wertes von pNL-ΔEnv an. ¹ Wert liegt im Hintergrundbereich. ² Die Verdünnung dieser Probe für die Messung im p24-ELISA wurde zu hoch angesetzt und lieferte daher einen negativen Wert.

Eine wichtige Kontrolle für das hier durchgeführte Experiment in bezug auf das ausreichende Waschen der Infektionen stellte die Infektion mit pNL-ΔEnv-Virionen dar: diese Virionen synthetisieren kein Env-Protein und können daher keine Infektion initiieren. Die in diesem Ansatz erhaltenen Werte dienten somit als Hintergrund-Werte für unspezifisch mit Zellen assoziierte Virionen, welche selbst durch mehrmaliges Waschen der infizierten Zellen nicht

entfernt werden konnten und deswegen nach 24 Stunden im Zellkulturüberstand vorhanden sind.

Im Falle von MT-4-Zellen waren alle in den jeweiligen Infektionsansätzen gemessenen p24-Werte signifikant höher als die Hintergrundwerte. Wieder konnte die schon in den beiden vorangegangenen Kapiteln gemachte Beobachtung bestätigt werden, daß die Infektiosität von zellfreien pNL-Tr752-Virionen gegenüber pNL-Wt-Virionen nur geringfügig reduziert ist, sie betrug in diesem Versuch rund 40% der Infektiosität von pNL-Wt-Virionen. Diese Reduktion ist sowohl bei MT-4-Virionen als auch bei H9-Virionen zu beobachten. Die relative Infektiosität von pNL-Tr752(N750K)-Virionen war im Fall von MT-4-Virionen um die Hälfte reduziert bzw. im Fall von H9-Virionen leicht erhöht. Die in H9-Zellen gemessenen p24-Werte lagen alle im Hintergrundbereich, worauf in 4.7 genauer eingegangen wird.

Wiederum ist es wie in den in 4.6.2.1 beschriebenen FACS-Analysen offensichtlich, daß H9-Virionen weitaus infektiöser sind als MT-4-Virionen, und zwar im hier gezeigten Versuch um 50-200 mal.

4.7 Zellfreie HIV-1-Infektion von H9-Zellen

In den vorangegangenen Analysen zur Infektiosität zellfreier Virionen wurde sehr deutlich, daß H9-Zellen äußerst ineffizient von zellfreien Virionen infiziert werden können. Auf diesen Aspekt soll hier noch einmal gesondert eingegangen werden, da dieses Ergebnis von wesentlicher Bedeutung ist.

4.7.1 Detektion zellfrei infizierter H9-Zellen

In den vorangegangenen beiden Kapiteln war es mit keiner der durchgeführten Methoden möglich, produktiv durch zellfreie Virionen infizierte H9-Zellen zu detektieren. So wurden bei der *de novo*-Virusproduktion in H9-Zellen 24 Stunden nach Infektion mit den verschiedenen zellfreien Virionen im p24-ELISA ausschließlich Werte gemessen, die im Hintergrundbereich der Kontrollinfektion mit pNL-ΔEnv-Virionen lagen. Dagegen konnte die gleiche Menge der jeweiligen zellfreien Virionen MT-4-Zellen sehr effizient infizieren (siehe 4.6.2.2).

Auch in den in FACS-Analysen infizierter H9-Zellen (siehe 4.6.2.1) war die Anzahl produktiv infizierter H9-Zellen stets zu gering, um ausgewertet zu werden. Abb. 4.27 zeigt eine FACS-Analyse von H9-Zellen 24 Stunden nach Infektion mit aus H9-Zellen stammenden pNL-Wt-Virionen im Vergleich zu infizierten MT-4-Zellen.

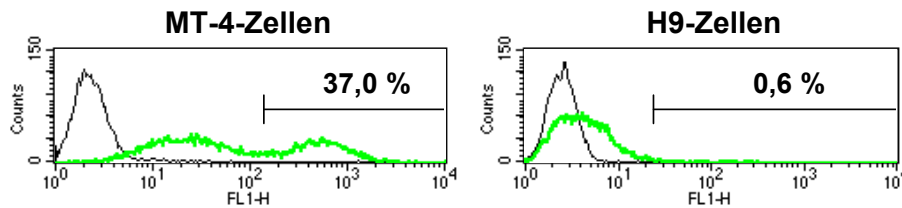


Abb. 4.27: FACS-Analyse der zellfreien pNL-Wt-Infektion von MT4- und H9-Zellen.

Die Infektionen von MT-4 und H9-Zellen mit zellfreien aus H9-Zellen stammenden pNL-Wt-Virionen ($0,3 \mu\text{g p24 pro } 10^6$ Zellen) wurden wie in 4.6.2.1 beschrieben durchgeführt. 24 Stunden nach Infektion erfolgte die intrazelluläre p24-FACS-Färbung mit dem FITC-gekoppelten Antikörper KC57-FITC in einem permeabilisierenden Puffer und die Messung der Fluoreszenz der Zellen im FACS-Gerät. Die schwarze Kurve repräsentiert jeweils die Messung uninfizierter gefärbter Zellen, die grüne Kurve jeweils die Messung der infizierten gefärbten Zellen. Der Anteil der produktiv infizierten Zellen der Gesamtzellpopulation wurde durch Ausgrenzung des ersten stärker fluoreszierenden Gipfels ermittelt, der nicht produktiv infizierte Zellen darstellt (siehe 4.6.2.1).

Die FACS-Analyse zeigt, daß dieselben Mengen zellfreier pNL-Wt-Virionen, die 37% der MT-4-Zellen infizieren konnten, in H9-Zellen nicht in der Lage waren, mehr als 0,6% der Zellen zu infizieren. Selbst bei Verwendung sehr hoher Virionenmengen für die Infektion von bis zu $5 \mu\text{g p24 pro } 10^6$ Zellen konnte in den FACS-Analysen keine signifikante Menge produktiv infizierter H9-Zellen detektiert werden.

Diese Beobachtung macht sehr deutlich, daß H9-Zellen offenbar um ein Vielfaches schlechter von zellfreien Virionen infizierbar sind als MT-4-Zellen. Das bedeutet möglicherweise, daß Virusausbreitung in H9-Zellen hauptsächlich durch Zell-Zell-Transmission und kaum durch Infektionsvorgänge zellfreier Virionen vermittelt wird. Im Fall von pNL-Wt scheinen sehr geringe Mengen initial durch zellfreie Virionen infizierter Zellen auszureichen, damit sich das Virus per Zell-Zell-Transmission in der Zellkultur ausbreiten kann. Zellfreie pNL-Tr752-Virionen infizieren ebenso wie pNL-Wt-Virionen initial eine sehr geringe Menge von H9-Zellen (siehe Abb. 4.4 E), können sich dann aber nicht in der Kultur ausbreiten. In diesem Kontext kann man spekulieren, daß der Env-CT eine potentielle Rolle in der Zell-Zell-Transmission von HIV-1 spielt.

4.7.2 Oberflächenexpression zellulärer HIV-1-Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle in MT-4- und H9-Zellen.

Um weitere Erklärungen für die im Vergleich zu MT-4-Zellen schlechtere Infizierbarkeit von H9-Zellen durch zellfreie Virionen zu finden, sollte per FACS-Analyse untersucht werden, ob sich die beiden Zelllinien in der Oberflächenexpression des Rezeptores bzw. Korezeptors von HIV-1, CD4 und CXCR4, voneinander unterscheiden. Weiterhin wurde die Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle LFA-1 und ICAM-1 analysiert. Es wurde

gezeigt, daß diese Moleküle sowohl einen Einfluß auf die Infizierbarkeit von Zellen als auch auf die Infektiosität von Viren haben (Fortin *et al.*, 1997; Fortin *et al.*, 1998). Auch das zelluläre Proteoglykan Heparansulfat sollte hinsichtlich seiner Oberflächenexpression untersucht werden, da gezeigt wurde, daß Heparansulfat die Bindung von HIV-1-Virionen an Zellen vermitteln konnte (Patel *et al.*, 1993). An der Bindung an Heparansulfat sind die V3-Schleife von gp120 (Roderiquez *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2002) und in der viralen Membran vorkommendes Cyclophilin A (Saphire *et al.*, 1999) beteiligt.

Für die FACS-Analysen wurden MT-4- und H9-Zellen nach 20-minütiger Fixierung in 3% PFA in PBS wie in 3.5.2 beschrieben mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt und anschließend im FACS-Gerät vermessen. Für die Färbung von CD4, CXCR4, LFA-1 und ICAM-1 wurden die in 2.1.1 beschriebenen Erstantikörper benutzt, gefolgt von einer Färbung mit fluoreszierenden PE-gekoppelten Zweitantikörpern. Für die Färbung von Heparansulfat (HPS) wurde ein FITC-gekoppelter Antikörper verwendet. Als Negativkontrolle dienten jeweils nur mit dem PE-Zweitantikörper bzw. nur mit einem FITC-gekoppelten gt- α -mo-Antikörper inkubierte Zellen. Das Ergebnis der Analysen ist in Tab. 4.3 dargestellt, welche die geometrischen Mittelwerte der Fluoreszenzintensität der jeweiligen Ansätze zeigt.

Tab. 4.3: FACS-Analyse der Oberflächenexpression der HIV-1-Rezeptoren und zellulärer Adhäsionsmoleküle in MT-4- und H9-Zellen.

	-	CD4	CXCR4	ICAM-1	LFA-1	HPS
MT-4	3,0	142,7	7,6	20,7	21,4	77,2
H9	3,7	21,1	9,2	38,0	7,7	86,8

Uninfizierte MT-4- und H9-Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern für die hier untersuchten Proteine gefärbt. Angegeben ist die mittlere geometrische Fluoreszenzintensität der jeweiligen Färbung. HPS = Heparansulfat.

Die Tabelle zeigt, daß MT-4-Zellen eine ca. siebenmal stärkere Expression für CD4 aufwiesen als H9-Zellen, die mittlere geometrische Fluoreszenzintensität betrug in MT-4-Zellen 142,7 und in H9-Zellen nur 21,1.

Das Expressionsniveau von CXCR4 und HPS war in beiden Zelllinien in etwa gleich, während die Expression von ICAM-1 in den H9-Zellen (38,0) doppelt so hoch war wie in MT4-Zellen (20,7) und die Expression von LFA-1 dagegen in H9-Zellen um das dreifache reduziert (7,7) im Vergleich zu MT-4-Zellen (21,4).

Möglicherweise tragen die unterschiedlichen Expressionsniveaus, insbesondere von CD4 und LFA-1, zur schlechteren Infizierbarkeit von H9-Zellen durch zellfreie Virionen bei (siehe hierzu auch 5.4.3).

5. DISKUSSION

5.1 Replikation in permissiven und nicht permissiven Zellen

5.1.1 Phänotypen der HIV-1-Mutanten

Am Anfang der Arbeit wurden die Replikationseigenschaften der in Env-CT bzw. Env-TMD mutierten Viren im Vergleich zu pNL-Wt in verschiedenen Zelllinien untersucht. Dabei wurde der für pNL-Tr712 bereits beschriebene Phänotyp der Zelltyp-spezifischen Replikationskompetenz (Akari *et al.*, 2000; Murakami und Freed, 2000a) bestätigt und auf die anderen hier analysierten Virusmutanten übertragen.

In permissiven MT-4- oder C8166-Zellen konnten alle Virusmutanten replizieren, allerdings im Fall der Viren mit trunkierten Env-CTs leicht verzögert im Vergleich zu pNL-Wt. Interessanterweise waren in MT-4- und C8166-Zellen hinsichtlich der Replikationseigenschaften der einzelnen Mutanten Unterschiede zu beobachten. Dagegen konnten Virusmutanten mit trunkierten Env-CTs nicht in H9-Zellen replizieren. Zwar wurde initial eine geringe Anzahl von Zellen infiziert, die auch Virionen produzierten, jedoch breitete sich die Infektion nicht in der Zellkultur aus. Analog zu diesem Ergebnis belegen zahlreiche Studien, daß die Präsenz des Env-CTs in den meisten infizierbaren T-Zell-Linien unabdingbar ist, und daß bereits kleine Trunkationen oder Extensionen von sechs Aminosäuren nicht toleriert werden (Dubay *et al.*, 1992; Chan *et al.*, 2004), was auf die Notwendigkeit einer präzis definierten Länge des Env-CTs schließen läßt.

Unter Retroviren variiert die Notwendigkeit der Präsenz des Env-CTs. Im Fall von *Rous sarcoma virus* kann der ganze Env-CT ohne nachteilige Auswirkungen für die Replikation in aviären Zellen entfernt werden (Perez *et al.*, 1987), während *murine leukemia virus* keine Env-Trunkation toleriert (Granowitz *et al.*, 1991). Möglicherweise existieren jedoch auch hier verschiedene permissive und nicht-permissive Zellsysteme, oder eventuell besitzt der Env-CT nicht-lentiviraler Retroviren generell eine andere Funktionalität als der lentivirale Env-CT. Ein interessantes Phänomen ist bei dem Lentivirus *simian immunodeficiency virus* (SIV) zu beobachten, dessen Env-CT hinsichtlich seiner Länge und seinem Aufbau ähnlich dem HIV-1-Env-CT ist. Bei einer Propagation von SIV-Isolaten in humanen T-Zell-Linien kommt es zu einer Selektion von SIV-Varianten mit trunkierten Env-CTs (Kodama *et al.*, 1989), was von einer gesteigerten Infektiosität der SIV-Virionen sowie erhöhter Fusogenität und erhöhtem Einbau der Env-Proteine in Virionen begleitet ist (Ritter *et al.*, 1993; Zingler und Littman, 1993). Nach Passage dieser SIV-Varianten in Makaken kommt es während der Replikation wieder zu einer Reversion der trunkierten Env-Proteinen zu Proteinen voller Länge (Hirsch *et*

al., 1989; Luciw *et al.*, 1998). Es ist nicht geklärt, welchem Selektionsdruck diese Vorgänge unterliegen, jedoch scheint es, daß der SIV-Env-CT für eine Viruspropagation *in vivo* benötigt wird, aber von keiner großen Relevanz in nicht-homologen Zellsystemen ist.

In H9-Zellen wies das in Env-TMD mutierte HIV-1-Derivat pNL-TmR-I eine gegenüber pNL-Wt verzögerte Replikationsgeschwindigkeit auf, was bereits in einer anderen Studie gezeigt wurde (Helseth *et al.*, 1990b). TmCD22 mit einem Austausch der Env-TMD gegen die TMD von CD22 replizierte dagegen in H9-Zellen erheblich verzögert und konnte nur nach Langzeitkultur die ganze Zellkultur infizieren (siehe auch 5.1.3).

5.1.2 Basis der Permissivität von Zelllinien

Der Zelltyp-abhängige Phänotyp der Viren, die in Env-CT bzw. Env-TMD mutiert sind, läßt die offensichtliche Frage aufkommen, was der Grund für die Permissivität gewisser Zelllinien für diese Virusmutanten ist.

Es ist bekannt, daß sowohl MT-4- als auch C8166-Zellen HTLV-1-transformiert sind und Tax exprimieren (Sodroski *et al.*, 1984; Jeang *et al.*, 1990; Jeang *et al.*, 1997). Da HTLV-1-Tax tief in die zelluläre Genexpression eingreift (Azran *et al.*, 2004) und die Replikation von HIV-1 begünstigt (Kiernan *et al.*, 1990), ist es denkbar, daß diese beiden Zelllinien ausschließlich nur aufgrund der zellulären HTLV-1-Tax-Expression einen permissiven Phänotyp aufweisen. Um zu überprüfen, ob die Tax-Expression zu einer Permissivität von H9-Zellen für Virusmutanten mit trunkierten Env-CTs führen würde, wurden H9-Zellen stabil mit einem bizistronischen für HTLV-1-Tax und GFP kodierenden Vektor transduziert. Die Tax-Expression der Zellen wurde indirekt durch GFP-Expression bestätigt. Auffallend war, daß die Tax-Expression offenbar nachteilige Auswirkungen auf die Zellen hatte. Innerhalb der transduzierten Zellpopulation besaßen nicht und schwächer GFP- (und somit auch Tax-) exprimierende H9-Zellen offenbar einen Selektionsvorteil.

In Replikationsanalysen wurde gezeigt, daß sich pNL-Tr712 in der transduzierten H9-Population nicht vermehren konnte. Das bedeutet, daß möglicherweise die Menge an in H9-Zellen exprimiertem Tax nicht ausreichte, um den nicht-permissiven Phänotyp aufheben zu können, oder daß nicht die HTLV-1-Tax-Expression *per se* der Grund für den permissiven Phänotyp von Zelllinien wie MT-4 oder C8166 ist. Gegen die Möglichkeit einer auf HTLV-1-Tax basierenden Permissivität sprechen auch zahlreiche Replikationsanalysen von Virusmutanten mit trunkierten Env-CTs in MT-2-Zellen, die in erheblichem Maß Tax als auch HTLV-1-Virionen exprimieren (Miyoshi *et al.*, 1981). Auch in diesen Zellen konnten die

meisten Viren mit trunkierten Env-CTs nicht replizieren (Yu *et al.*, 1993; Murakami und Freed, 2000a).

Eine andere Möglichkeit der Begründung für die Permissivität mancher Zellen für Virusmutanten mit trunkierten Env-CTs ist die, daß der Env-CT in nicht-permissiven Zellen gewisse Prozesse für eine erfolgreich verlaufende Replikation aktiviert. Er könnte beispielsweise essentielle Signalkaskaden aktivieren oder wichtige zelluläre Proteine an relevante Stationen des lentiviralen Replikationszyklus rekrutieren. Die Aktivierung dieser Prozesse wäre demzufolge in permissiven Zellen nicht notwendig. Die zu diesem Ansatz durchgeführte Komplementationsanalyse des Replikationsverhaltens von pNL-Tr712 in H9-Zellen, die stabil eine membrangebundene Form des Env-CTs exprimierten, zeigte jedoch, daß es zu keiner Ausbreitung der mutanten Virionen kam. Möglicherweise ist der Env-CT alleine nicht funktionell, sondern muß aufgrund konformationeller Eigenschaften oder Restriktionen hinsichtlich der Lokalisation im Kontext des kompletten Env-Proteins exprimiert werden.

5.1.3 Die potentielle *second site*-Revertante pNL-TmCD22'

Wie in 5.1.1 beschrieben wies pNL-TmCD22 in H9-Zellen einen erheblichen Defekt hinsichtlich seiner Replikationskompetenz auf und konnte nur nach Langzeitkultur die ganze Zellkultur infizieren. Weitere Replikationsanalysen zeigten, daß die im Überstand der infizierten H9-Langzeitkultur befindliche Variante pNL-TmCD22' zwar langsamer als pNL-Wt, aber erheblich schneller als die Mutante pNL-TmCD22 im ursprünglichen Experiment replizieren konnte. In PBMCs dagegen konnte pNL-TmCD22' nicht replizieren.

Die Analyse der proviralen *matrix*- und *env*-Gene der infizierten Zellen auf potentielle *second site*-Mutationen hin, die die Variante pNL-TmCD22' zu dieser höheren Replikationskompetenz befähigt haben, ergab, daß ein Nukleotidaustausch an Position 6463 im *env*-Gen (BH10-Nummerierung) stattgefunden hatte, der in der gp120-Domäne zu einem Austausch von Alanin zu Valin an As-Position 70 führt. Hierbei handelt es sich um einen relativ konservativen Aminosäureaustausch: Valin besitzt lediglich eine Methylgruppe mehr als Alanin.

Es wurde im Rahmen der Arbeit darauf verzichtet, den Aminosäureaustausch in die Nukleotidsequenz von pNL-TmCD22 einzubringen, um zu überprüfen, ob tatsächlich dieser Austausch alleine für die gesteigerte Replikationskompetenz von pNL-TmCD22 zuständig war, oder ob andere nicht detektierte Mutationen außerhalb von *matrix* und *env* für den

veränderten Phänotyp verantwortlich waren. Laufende Experimente werden diese Frage in Kürze beantworten können.

5.1.4 Die phänotypische Revertante pNL-Tr752(N750K)

Die in der Arbeit analysierte Virusvariante pNL-Tr752(N750K) konnte trotz eines trunkierten Env-CTs in nicht-permissiven Zellen und - obwohl etwas reduziert - in PBMCs replizieren. Das bedeutet, daß für eine erfolgreiche HIV-1-Replikation in nicht-permissiven Zellen nicht unbedingt ein Env-CT voller Länge vorhanden sein muß.

Bis heute gibt es nur wenige Veröffentlichungen über die Isolierung natürlich vorkommender replikationskompetenter HIV-1-Varianten mit trunkierten Env-CTs. Ein Beispiel ist die HIV-1-Variante KB-1_{gp32}, die durch Kokultur der aus einem HIV-1-infizierten Patienten stammenden PBMCs mit MT-2-Zellen gewonnen wurde. Diese Variante besitzt durch Auftreten eines verfrühten Stop-Kodons in *env* einen trunkierten Env-CT von nur 18 Aminosäuren und konnte neben MT-2-Zellen auch in TALL-1- und MT-4-Zellen replizieren (Shimizu *et al.*, 1990). Ein weiteres Beispiel stellt die Isolierung der in Env-CT trunkierten Variante RF_{gp34} des HIV-1-Referenzstammes RF aus chronisch infizierten H9-Zellen dar. RF_{gp34} besitzt einen trunkierten Env-CT von 51 Aminosäuren und war in der Lage, neben H9-Zellen auch in Hut78-Zellen und PBMCs zu replizieren (Jones *et al.*, 2002). Aus beiden Studien geht jedoch jeweils nicht hervor, ob bzw. welche kompensatorische *second site*-Mutationen zum replikationskompetenten Phänotyp der Virusmutanten mit trunkierten Env-CTs beigetragen haben. pNL4-3-abgeleitete molekulare Klone der Variante KB-1_{gp32}, in die nur das entsprechende Stop-Kodon eingefügt wurde, waren nicht mehr replikationskompetent in MT-2- und TALL-1-Zellen (Shimizu *et al.*, 1992).

Die hier untersuchte Variante pNL-Tr752(N750K) wurde durch den Austausch einer einzigen Aminosäure von Asparagin zu Lysin an Position 750 (AAC→AAA, N750K) im einfach mutierten Virus pNL-Tr752 generiert. Anschließend konnte gezeigt werden, daß allein dieser einzelne Aminosäureaustausch für die gesteigerte Replikationskompetenz verantwortlich ist: die Variante pNL-Tr752(N750K) replizierte in MT-4-Zellen so schnell wie pNL-Wt, während die ursprüngliche Mutante pNL-Tr752 etwas verlangsamt replizierte.

In H9-Zellen konnte die N750K-Mutation den Replikationsblock von pNL-Tr752 aufheben. Allerdings replizierte sie etwas verlangsamt im Vergleich zu pNL-Wt, war aber in der Lage, die H9-Kultur zu 100% zu infizieren und sich auch in PBMCs auszubreiten. Ein Teil dieser Verzögerung war auf die N750K-Mutation *alleine* zurückzuführen, da pNL-Wt, in welches die N750K-Mutation eingefügt wurde, ebenfalls verzögert replizierte. Hier ist es wichtig

anzumerken, daß der *rev*-Leserahmen durch die Insertion der N750K-Mutation nicht geändert wurde.

Einen weiteren Hinweis darauf, daß die Punktmutation N750K tatsächlich alleine für die Infektiosität von pNL-Tr752(N750K) in H9-Zellen verantwortlich ist und möglicherweise sogar der einzige Aminosäureaustausch ist, der pNL-Tr752 in H9-Zellen Infektiosität verleihen kann, stellt die Tatsache dar, daß die phänotypische Revertante pNL-Tr752(N750K) erneut in H9-Zellen selektiert wurde.

Diese Tatsache und die Fähigkeit der bedingten Replikationskompetenz in PBMCs bedeuten, daß die N750K-Mutation auf erhebliche Weise einen Defekt kompensieren kann, den der trunkierte Env-CT in pNL-Tr752 hervorruft. Daher wurde überprüft, ob die N750K-Mutation auch den Zelltyp-abhängigen defekten Phänotyp von pNL-Tr813 kompensieren kann. Dabei wurde festgestellt, daß die Variante pNL-Tr813(N750K) zwar in MT-4-Zellen schneller als die ursprüngliche Mutante pNL-Tr813 replizierte, aber in H9-Zellen keine Infektion etablieren konnte (Daten nicht gezeigt).

Der Mechanismus, durch den die N750K-Mutation der Mutante pNL-Tr752 Replikationskompetenz verleiht, ist nicht bekannt. Datenbankrecherchen ergaben die Existenz eines einzigen HIV-1-Patienten-Isolats, welches für einen Lysin-Rest an Position 750 von Env kodierte (D31, GenBank Nr. U43096), welches allerdings nicht näher beschrieben ist. Das seltene *in vivo*-Auftreten dieser Mutation ist zumindest im Kontext eines Env-Proteins voller Länge konsistent mit dem hier erhaltenen Ergebnis, daß die Replikation von pNL-Wt durch Insertion dieser Mutation nachteilig beeinflusst wird. In diesem Zusammenhang ist es ebenfalls äußerst interessant, daß in der Sequenz der aus chronisch HIV-1-infizierten H9-Zellen isolierten Variante RF_{gp34} mit trunkiertem Env-CT (siehe oben) neben diversen anderen Änderungen in der Env-Proteinsequenz ein Aminosäureaustausch an Position 750 von Asparagin zu Serin (AAT→AGT, N750S) detektiert wurde (Jones *et al.*, 2002). Auch hierbei kommt es zu keiner Änderung im überlappenden *rev*-Leserahmen. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, daß die Aminosäureposition 750 in Env tatsächlich erheblichen Einfluß auf das Replikationsverhalten von Virionen haben kann, welche für Env-CTs kodieren, die kurz nach dieser Position trunkiert sind: pNL-Tr752(N750K) besitzt nach Position 750 nur noch zwei und RF_{gp34} nur noch sechs weitere Aminosäuren.

Die Aminosäureposition 750 ist nicht in bekannten Motiven des HIV-1-Env-CTs lokalisiert und es gibt bisher keine mechanistische Erklärung für Auswirkungen von Mutationen an dieser Position auf das Replikationsverhalten. Wie in 1.5.2.1 beschrieben postuliert die Arbeitsgruppe um N. Dimmock, daß dieser Teil von gp41 in einer Schleife an der Außenseite der Zelle bzw. des Virus lokalisiert ist (Cleveland *et al.*, 2002). Hier lokalisierte

Aminosäureänderungen könnten daher rein spekulativ Auswirkungen auf die Funktionalität und Konformation dieser Region besitzen.

Auch wenn der detaillierte Mechanismus nicht bekannt ist, durch den die N750K-Mutation der in nicht-permissiven Zellen defekten Virusmutante pNL-Tr752 Replikationskompetenz verleihen kann, hat man jedoch mit den beiden auf pNL-Tr752 basierenden Virusmutanten ein ideales Werkzeug in der Hand, um die Ursachen für den Zelltyp-abhängigen Replikationsblock von Viren mit trunkierten Env-CTs zu untersuchen: beide besitzen Env-Proteine gleicher Länge und unterscheiden sich sonst nur durch eine einzige Aminosäure, weisen aber einen völlig unterschiedlichen Phänotyp hinsichtlich der Replikation in nicht-permissiven Zellen auf.

5.2 Einbau mutierter Env-Proteine in Virionen

Kürzlich veröffentlichte Arbeiten zeigen im Falle von zwei HIV-1-Mutanten mit trunkierten Env-CTs, daß deren Zelltyp-abhängiger defekter Phänotyp hinsichtlich der Replikationskompetenz auf einem defekten Glykoprotein-Einbau in Virionen beruht. Die Autoren postulieren, daß in nicht-permissiven Zellen die Interaktion von noch unbekannten Faktoren mit Env-CT für einen Glykoprotein-Einbau in Virionen essentiell ist (Akari *et al.*, 2000; Murakami und Freed, 2000a).

Aus diesem Grund wurden auch in der vorliegenden Arbeit Analysen zum Glykoprotein-Einbau durchgeführt. Es zeigte sich, daß alle hier analysierten Env-Proteine in Virionen eingebaut wurden, und zwar unabhängig davon, ob sie von MT-4- oder H9-Zellen freigesetzt wurden. Die Mengen der in MT-4- oder H9-Virionen eingebauten mutierten Glykoproteine gegenüber Wt-Env waren hierbei stets ähnlich bzw. nur leicht vermindert. Eine Ausnahme stellten Env-Tr752(N750K)-Virionen aus MT-4 und H9-Zellen dar, in denen reproduzierbar stets größere Mengen an gp120 und der trunkierten Form von gp41 (gp30) detektiert werden konnten als in pNL-Wt-Virionen. Besonders hervorgehoben werden soll das Ergebnis für pNL-Tr712, da diese Mutante ebenfalls in den eingangs beschriebenen Publikationen analysiert wurde, wobei dort ein ca. zehnfach reduzierter Einbau des mutierten Glykoproteins gegenüber Wt-Env gezeigt wurde. In den hier durchgeführten Versuchen wurde gp120 in pNL-Tr712-Virionen allerdings in gleichen Mengen detektiert wie in pNL-Wt-Virionen.

Die Gründe für das Divergieren der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse von den publizierten Daten sind nicht klar. Da die Versuche soweit ersichtlich gleich durchgeführt wurden, ist es eher unwahrscheinlich, daß dies auf Unterschiede in der Versuchsdurchführung zurückzuführen ist. Es ist auch unwahrscheinlich, daß der erhaltene

Einbau in dieser Arbeit auf Kontamination der Virionenpräparationen durch zelluläre Membranvesikel oder Zelldebris beruht, was ein häufiges Problem bei der Aufreinigung von Virionen per Ultrazentrifugation darstellt (Bess *et al.*, 1997; Gluschankof *et al.*, 1997). Da jedoch ausschließlich gp120 in den Lysaten der Viruspartikel detektiert wurde, ist diese Möglichkeit nahezu auszuschließen. Bei einer Kontamination durch Membranvesikel wären beträchtliche Spuren von gp160 bzw. der gp160-Derivate in den Lysaten aufgereinigter Virionenpräparationen zu erkennen gewesen.

Für die Glykoprotein-Inkorporation transmembranal mutierter Env-Proteine in von nicht-permissiven Zellen freigesetzte Virionen liegen in der Literatur keine Daten vor. Einbaustudien mit Viruspartikeln, welche aus MT-4-Zellen freigesetzt wurden, zeigten, daß Env-TmR-I und Env-TmCD22 gegenüber Wt-Env in verringertem Maß eingebaut wurden, obwohl die Virusmutanten in MT-4-Zellen genauso schnell replizierten wie pNL-Wt (Wilk *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde für diese beiden Mutanten sowohl in MT-4- als auch in H9-Zellen kein Einbaufekt festgestellt.

Zusammenfassend gesagt scheinen sowohl Env-CT als auch Env-TMD nicht für einen erfolgreichen Glykoprotein-Einbau in Virionen aus nicht-permissiven Zellen zuständig zu sein. Analog dazu postulieren auch Piller *et al.* (2000), daß andere Faktoren als allein der Glykoprotein-Einbau den Zelltyp-abhängigen Defekt bestimmen müssen, da aus nicht-permissiven Zellen stammende Virionen mit Mutationen in Env-CT zwar eine deutlich verringerte Infektiosität in *single round of infection*-Analysen besaßen, aber dennoch signifikante Mengen an eingebauten Glykoproteinen aufwiesen.

5.3 Funktionalität der mutierten Env-Proteine

Eine andere Erklärung für den Zelltyp-abhängigen defekten Phänotyp der Virusmutanten wäre eine durch die eingeführte Mutation gestörte Funktionalität der Glykoproteine hinsichtlich ihrer Fusogenität, die sich nur in nicht-permissiven Zellen bemerkbar machen würde. Durch etwa eine unterschiedliche Zusammensetzung der Plasmamembran beider Zelllinien könnte die mutierte Form der Glykoproteine in nicht-permissiven Zellen oder in daraus freigesetzten Virionen eine funktionell inaktive Konformation einnehmen.

In einem semi-quantitativen Zell-Zell-Fusions-Versuch wurde jedoch gezeigt, daß die mutierten Glykoproteine im Rahmen einer Infektion in permissiven und nicht-permissiven Zellen fusionskompetent waren. Hierbei war insbesondere für Env-Tr752(N750K) und Env-Tr712 und in verringertem Maß auch für Env-Tr752 eine Steigerung der Fusogenität gegenüber Wt-Env zu beobachten, und zwar sowohl bei Expression in MT-4- als auch in H9-

Zellen. Wichtig ist es zu unterstreichen, daß diese gesteigerte Fusionskapazität dabei keine schädlichen Auswirkungen auf die Replikationskompetenz in nicht-permissiven Zellen hat, da pNL-Tr752(N750K) das Glykoprotein mit der höchsten Fusionskapazität besitzt und erfolgreich eine Infektion in H9-Zellen etablieren kann. Die anderen mutierten Proteine wiesen ähnliche Fusionskapazitäten wie Wt-Env auf.

Eine Erhöhung der Membranfusionskompetenz von retroviralen C-terminal trunkierten Glykoproteinen ist ein Phänomen, das bereits von mehreren Autoren für HTLV-1 (Pique *et al.*, 1993), SIV (Spies *et al.*, 1994) und HIV-2 (Mulligan *et al.*, 1992) gezeigt wurde. Auch für HIV-1 liegen mannigfache Untersuchungen zu diesem Phänomen vor, die größtenteils zeigen, daß insbesondere ausgedehnte Trunkationen des Env-CTs die Fusionskapazität von Env gegenüber Wt-Env beträchtlich erhöhen, wohingegen kleinere Trunkationen von Env-CT oder Mutationen in Env-TMD die Fusogenität nicht beeinträchtigen oder eher einen negativen Effekt darauf haben (Helseth *et al.*, 1990a; Helseth *et al.*, 1990b; Earl *et al.*, 1991a; Wilk *et al.*, 1992; Wilk *et al.*, 1996; Freed und Martin, 1996; Edwards *et al.*, 2002). Allerdings existieren auch mehrere Studien, die zeigen, daß es durch ausgedehnte Trunkationen des Env-CTs zu keiner oder nur geringfügiger Veränderung in der Env-Fusionskapazität kommt (Gabuzda *et al.*, 1992; Dubay *et al.*, 1992). Diese widersprüchlichen Daten sind möglicherweise darin begründet, daß für die verschiedenen Studien unterschiedliche Methoden benutzt wurden, so daß je nach Versuchsdurchführung und verwendetem Zellsystem unterschiedliche Ergebnisse erhalten wurden.

Eine gesteigerte Fusionskapazität könnte in der erhöhten Oberflächenexpression trunkierter Glykoproteine begründet sein. Es existieren Daten, die im Kontext von SIV eine erhöhte Oberflächenexpression trunkierter Env-Proteine belegen (Yuste *et al.*, 2004), während in anderen Studien keine erhöhte HIV-Env-Oberflächenexpression beobachtet werden konnte (Yu *et al.*, 1993; Murakami und Freed, 2000a). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mittels Oberflächenbiotinylierung von H9-Zellen untersucht, in welchem Verhältnis die zelluläre Oberflächenexpression der mutierten Env-Proteine zu deren Fusionskapazität steht. Eine gegenüber Wt-Env jeweils in ähnlichem Maß erhöhte Oberflächenexpression wurde nur für Env-Tr712, Env-Tr752 und Env-Tr752(N750K) beobachtet, also für diejenigen Mutanten, welche Wt-Env gegenüber eine erhöhte Fusionskapazität aufwiesen. Somit könnte die erhöhte Fusionskapazität dieser Env-Proteine zumindest teilweise eine indirekte Folge ihrer erhöhten Oberflächenexpression sein. Die Expression von Env-Tr712, Env-Tr752 und Env-Tr752(N750K) war allerdings auch in den H9-Gesamtzelllysaten erhöht, was möglicherweise auf eine höhere Stabilität dieser trunkierten Env-Proteine hinweist und bedeuten könnte, daß die erhöhte Oberflächenexpression eine Konsequenz der erhöhten zellulären Expression ist.

Erhöhte Oberflächenexpression trunkierter Env-Proteine könnte auch auf die Entfernung des Dileucin-basierten Endozytose-Signals am distalen C-terminalen Ende des Env-CTs und anderer potentieller Endozytose-Signale (siehe 1.5.2.1) zurückzuführen sein. Analog zu dieser Möglichkeit wurde gezeigt, daß die Anwesenheit der Bereiche *is1* (As-Position 750-763) und *is2* (As-Position 764-785) in Env-CT einen negativen Effekt auf die Oberflächenexpression eines chimärischen CD4-Env-CT-Konstrukts hatte (Bültmann *et al.*, 2001). In *is1* befindet sich kein potentielles Endozytose-Motiv, dagegen sind aber in *is2* ein potentielles Tyrosin-basiertes und zwei Dileucin-basierte potentielle Endozytose-Signal(e) enthalten.

Eine andere Erklärung für die erhöhte Fusionskapazität trunkierter Env-Proteine stellt die potentielle Induktion konformationeller Änderungen in der extrazellulären Domäne von Env im Sinne einer Änderung der CD4-Bindungsfunktion dar, wie sie von Edwards *et al.* (2002) bereits beschrieben wurde. Besonders interessant erschien in diesem Kontext die etwa doppelt erhöhte Fusogenität von Env-Tr752(N750K) im Vergleich zu Env-Tr752, die allein durch die N750K-Mutation hervorgerufen wird. Jedoch konnte in *single round of infection*-Analysen in An- oder Abwesenheit blockierender CD4-Antikörper gezeigt werden, daß pNL-Tr752(N750K) keine CD4-unabhängige Virusvariante ist.

Die erhaltenen Daten zeigen weiterhin, daß die Höhe der Fusogenität der mutierten Env-Proteine nicht mit der Replikationskompetenz der entsprechenden Virusmutanten korreliert. Virusmutanten mit trunkierten Env-CTs wie pNL-Tr712 oder pNL-Tr752 können ein fusogeneres Env als pNL-Wt besitzen, aber dennoch nur verlangsamt (in MT-4-Zellen) oder überhaupt nicht (in H9-Zellen) replizieren. Auch hinsichtlich der Viren, welche Mutationen in Env-TMD tragen, insbesondere pNL-TmCD22, war in H9-Zellen keine Korrelation zwischen Fusogenität des Env-Proteins (so hoch wie Env-Wt) und Replikationskompetenz (erheblich verlangsamt) zu beobachten. Es wäre jedoch möglich, daß die mutierten Env-Proteine im Kontext der *viralen* Membran eine andere Fusionskapazität aufweisen als im Kontext der *zellulären* Membran. Ein entscheidender Unterschied ist das Vorhandensein der Matrix-Proteinschicht auf der Innenseite der viralen Lipidmembran. Diese unmittelbare Nachbarschaft und die hieraus resultierenden sterischen Restriktionen erfordern möglicherweise eine bestimmte Konformation des Env-CTs, damit Env-vermittelte Fusionsreaktionen erfolgreich ablaufen können. Eine für dieses Modell sprechende Divergenz zwischen Env-Fusionskapazität und Replikationskompetenz bzw. Infektiosität der entsprechenden Virusmutanten wurde bereits in der Literatur beschrieben (Gabuzda *et al.*, 1992; Dubay *et al.*, 1992).

5.4 Infektiosität zellfreier Virionen

HIV-1-Replikation in Zellkultur ist die Summe von Infektionsvorgängen durch zellfreie Virionen als auch von Zell-Zell-Transmission (siehe 1.4.4), daher liefern die in Replikationskinetiken erhaltenen Ergebnisse keine Aussage hinsichtlich des Phänotyps zellfreier Virionen alleine. Aufgrund des fehlenden Defekts der Virusmutanten hinsichtlich des Glykoprotein-Einbaus bzw. der Glykoprotein-Fusogenität war es nun von besonderem Interesse, die Infektiositäten zellfreier aus MT-4- und H9-Zellen stammender Virionen in verschiedenen *single round of infection*-Versuchen zu quantifizieren. Die Analysen erfolgten ausschließlich mit der in H9-Zellen nicht replikationskompetenten HIV-1-Mutante pNL-Tr752 und deren replikationskompetenter Variante pNL-Tr752(N750K) im Vergleich zu pNL-Wt. Als Zielzellen wurden einerseits TZM-bl-Zellen (HeLa-Derivate), andererseits MT-4- und H9-Zellen verwendet.

5.4.1 Quantifizierung der Infektiosität zellfreier Virionen aus MT-4- und H9-Zellen

Die in den verschiedenen Versuchen erhaltenen Ergebnisse zeigen reproduzierbar, daß zellfreie pNL-Tr752-Virionen aus H9-Zellen *per se* eine nur in geringem Maß reduzierte Infektiosität von 30-50% gegenüber pNL-Wt-Virionen besitzen, obwohl pNL-Tr752 in H9-Zellen keine Infektion etablieren kann. Stark hervorzuheben ist hierbei die Tatsache, daß auch pNL-Tr752-Virionen aus MT-4-Zellen in gleichem Ausmaß defekt zu sein scheinen, während diese Mutante dagegen in MT-4-Zellen replizieren kann. pNL-Tr752(N750K)-Virionen waren hinsichtlich ihrer Infektiosität nicht reduziert, und zwar unabhängig davon, in welchen Zellen sie produziert wurden.

Eine weitere interessante Beobachtung innerhalb der verschiedenen Infektiositäts-Analysen war, daß *alle* in H9-Zellen produzierten zellfreien Virionen infektiöser waren als die entsprechenden in MT-4-Zellen produzierten Virionen. Hierbei variierte der Faktor der gesteigerten Infektiosität je nach Versuchsdurchführung und -auswertung und betrug in TZM-bl-Zellen den Wert von 3 bis 8. Interessanterweise zeigten auch die Infektiositäts-Analysen der Untersuchungen von Akari *et al.* (2000), daß Wt-Virionen aus H9-Zellen in MAGI-Zellen ca. doppelt so infektiös sind wie Wt-Virionen aus MT-4-Zellen.

Single round of infection-Analysen von in Env-CT trunkierten HIV-1-Mutanten sind in der Literatur schon mehrfach beschrieben worden. Diese Studien wurden meistens im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten in nicht-relevanten Zellsystemen durchgeführt, so wurden z.B. durch Transfektion in 293T- oder

HeLa-Zellen gewonnene Virionen in CAT- oder MAGI-Assays untersucht (zur jeweiligen Methodik siehe Helseth *et al.* (1990a) sowie Kimpton und Emermann (1992)). Die hier erhaltenen Daten sind widersprüchlich. Die Analysen zeigen teilweise, daß relativ kleine Trunkationen des Env-CTs von bis zu etwa 90 Aminosäuren substantielle Defekte auf die Infektiosität mutanter Virionen haben können, während Mutanten mit ausgedehnteren Trunkationen in Env-CT, u.a. auch pNL-Tr712 und -Tr752, so infektiös waren wie Wildtyp-Virionen (Freed und Martin, 1996; Piller *et al.*, 2000, Murakami und Freed, 2000a). Andere Untersuchungen wiederum ergaben, daß auch Mutanten mit ausgedehnten Deletionen wie etwa pNL-Tr753 in ihrer Infektiosität erheblich reduziert sind (Helseth *et al.*, 1990; Gabuzda *et al.*, 1992).

Zwei neuere Studien zeigen Daten von Infektiositätsmessungen der Mutante pNL-Tr712, die jeweils in permissiven MT-4- und nicht-permissiven H9-Zellen produziert wurde (Murakami und Freed, 2000a; Akari *et al.*, 2000). Hier wurde jeweils im MAGI-Assay eine gegenüber pNL-Wt-Virionen erheblich reduzierte Infektiosität der aus H9-Zellen stammenden pNL-Tr712-Virionen festgestellt, die nicht zu beobachten war, wenn pNL-Tr712-Virionen in MT-4-Zellen produziert wurden. Beide Studien führen den defekten Glykoprotein-Einbau in Virionen aus nicht-permissiven Zellen als Grund für den Zelltyp-abhängigen defekten Phänotyp von Virionen mit trunkierten Env-CTs hinsichtlich ihrer Infektiosität als auch ihrer Replikationskompetenz an (siehe 5.2).

Die in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Infektiosität zellfreier Virionen erhaltenen Ergebnisse divergieren somit in dieser Aussage (ebenso wie im Punkt des Glykoprotein-Einbaus) von diesen beiden letztgenannten Studien, wobei die Gründe hierfür nicht klar sind. Es wurde zwar ein geringfügiger Defekt von pNL-Tr752-Virionen hinsichtlich der Infektiosität festgestellt, der sich allerdings bei Virus-Produktion sowohl in H9-Zellen *als auch* in MT-4-Zellen äußerte. Somit besitzt pNL-Tr752 zwar einen Zelltyp-abhängigen Defekt hinsichtlich seiner Replikationskompetenz in nicht-permissiven Zellen, aber nicht hinsichtlich der Infektiosität aus nicht-permissiven Zellen stammender Virionen.

Es ist allerdings gut möglich, daß sich die für pNL-Tr712 erhaltenen Ergebnisse der beiden eben erwähnten Studien nicht pauschal auf alle Virusmutanten mit trunkierten Env-CTs ausdehnen lassen. Deswegen wäre es von Wichtigkeit, die in der Arbeit durchgeführten Versuche auch mit pNL-Tr712-Virionen durchzuführen, um klären zu können, ob andere Ergebnisse als für pNL-Tr752 erhalten werden oder ob sich die in der Arbeit erhaltenen Ergebnisse grundsätzlich von denen von Murakami und Freed (2000a) unterscheiden.

5.4.2 Infizierbarkeit von H9-Zellen durch zellfreie Virionen

Eine äußerst wichtige und zentrale Beobachtung innerhalb der verschiedenen Infektiositäts-Experimente war schließlich, daß H9-Zellen nur äußerst ineffizient mit *sämtlichen* zellfreien Virionen, inklusive pNL-Wt-Virionen, infizierbar waren. Hierbei spielte es keine Rolle, ob die Virionen in MT-4-Zellen oder in H9-Zellen produziert wurden: dieselben Virionen, die MT-4-Zellen produktiv infizieren konnten, waren nicht in der Lage, H9-Zellen so effizient zu infizieren, daß man es in den *single round of infection*-Analysen hätte detektieren können.

Das Ergebnis, daß H9-Zellen nur sehr schlecht von zellfreien Virionen infizierbar sind, bedeutet hinsichtlich der replikativen Virusausbreitung, daß sich Infektionen in H9-Zellen wahrscheinlich in erster Linie über Zell-Zell-Transmission von Viren ausbreiten, und daß Infektionsvorgänge, die durch zellfreie Virionen vermittelt werden, nur eine äußerst minore Rolle spielen. Die bei Replikationsanalysen durch zellfreie Virionen vermittelte initiale Infektion von H9-Zellen ist nur sehr ineffizient und resultiert in der Infektion von nur einem sehr kleinen Teil der Zellen, unabhängig davon, ob die Infektion mit Wt-Virionen oder Virionen mit trunkierten Env-CTs gesetzt wird. Diese geringe Anzahl initial infizierter Zellen ließ sich zwar nicht in *single round of infection*-Analysen detektieren, jedoch konnte in Replikationsanalysen zu frühen Zeitpunkten der Infektion auch für Virusmutanten mit Trunkationen in Env-CT in der Immunfluoreszenz eindeutig HIV-infizierte Zellen detektiert werden. Im Fall von pNL-Wt reicht diese geringe Menge initial infizierter Zellen aus, um sich per Zell-Zell-Transmission vollständig in der Zellkultur ausbreiten zu können, während beispielsweise pNL-Tr752 mit einem trunkierten Env-CT dazu nicht in der Lage ist. Diese Fakten deuten darauf hin, daß der HIV-1-Env-CT möglicherweise bei der Zell-Zell-Transmission von Virionen eine Rolle spielt (siehe 5.5). In diesem Zusammenhang berichten McDonald *et al.* (2003), daß die Ausbreitung von HIV-1 in Hut/CCR5-Zellen, die mit H9-Zellen verwandt sind, sehr langsam stattfindet, und daß die Effizienz der Ausbreitung um ein Vielfaches durch die Anwesenheit von MDDCs (*myeloid-derived dendritic cells*) gesteigert werden kann, die allerdings selber nicht produktiv infiziert werden.

Bei der initialen Infektion von MT-4-Zellen wird im Gegensatz zu H9-Zellen schon initial eine große Anzahl an Zellen durch zellfreie pNL-Wt- und pNL-Tr752-Virionen effizient infiziert, was auch in *single round of infection*-Analysen detektiert werden kann, und möglicherweise findet die Virusausbreitung in MT-4-Zellen größtenteils durch Infektionsvorgänge durch zellfreie Virionen statt. Der Defekt von pNL-Tr752 bezüglich der Zell-Zell-Transmission würde sich in MT-4-Zellen daher nur unterrepräsentativ manifestieren. Möglicherweise ist das der Grund für die gegenüber pNL-Wt beobachtete geringfügige Verzögerung der Replikation von Virusmutanten mit trunkierten Env-CTs.

5.4.3 Oberflächenexpression von HIV-1-Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen in MT-4- und H9-Zellen

Um den Grund für die schlechtere Infizierbarkeit von H9-Zellen gegenüber MT-4-Zellen zu untersuchen, wurde die Oberflächenexpression der HIV-1-Rezeptoren CD4 und CXCR4 sowie der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, LFA-1 und Heparansulfat, die mit HIV-1-Adhäsion an Zellen in Verbindung gebracht wurden (siehe 4.7.2), in MT-4- und H9-Zellen analysiert. Es stellte sich heraus, daß H9-Zellen etwa siebenmal weniger CD4 auf ihrer Oberfläche exprimieren als MT-4-Zellen, was zumindest teilweise ein Grund für die unterschiedliche Infizierbarkeit durch zellfreie Virionen darstellen dürfte. CXCR4 und Heparansulfat sind hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression in beiden Zelllinien identisch. ICAM-1 wird doppelt so stark an der Oberfläche von H9-Zellen exprimiert wie an der Oberfläche von MT-4-Zellen, während die Oberflächenexpression von LFA-1 in MT-4-Zellen dreimal so hoch ist wie in H9-Zellen.

Die Messungen liefern möglicherweise auch Hinweise darauf, warum Virionen aus H9-Zellen infektiöser sind als Virionen aus MT-4-Zellen. Es wurde gezeigt, daß die Präsenz von ICAM-1 in der viralen Membran die Infektiosität von Virionen erheblich steigern kann. Dieses Phänomen tritt jedoch nur dann auf, wenn der entsprechenden Gegenspieler von ICAM-1, nämlich LFA-1, auf der Oberfläche der Zielzellen exprimiert wird (Fortin *et al.*, 1997; Fortin *et al.*, 1998). Das heißt, daß aus H9-Zellen freigesetzte Virionen aufgrund des Grades der zellulären Oberflächenexpression dieses Moleküls möglicherweise doppelt so viel ICAM-1 in ihre Membran einbauen wie Virionen aus MT-4-Zellen. Dies hätte laut den Daten der eben erwähnten Studie den Effekt, daß H9-Virionen effizienter Zellen infizieren können, die LFA-1 auf ihrer Oberfläche exprimieren.

Da MT-4-Zellen dreimal mehr LFA-1 exprimieren als H9-Zellen, sollten sie daher auch effizienter als H9-Zellen durch zellfreie Virionen infizierbar sein, wenn diese ICAM-1 in ihre Membran eingebaut haben. Diese theoretischen Überlegungen führen zur Schlußfolgerung, daß insbesondere die Infektion von MT-4-Zellen mit zellfreien H9-Virionen effizient sein muß (was in den durchgeführten *single round of infection*-Analysen auch beobachtet wurde), und daß die reduzierte LFA-1-Expression von H9-Zellen möglicherweise neben der reduzierten Expression von CD4 ebenfalls in die Begründung für die schlechtere Infizierbarkeit von H9-Zellen gegenüber MT-4-Zellen mit einbezogen werden kann.

5.5 Die Rolle des HIV-1-Env-CTs in der Virusreplikation

Tab. 5.1 faßt die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Eigenschaften der Virusmutanten mit trunkierten Env-CTs und mutierten Env-TMDs zusammen.

Tab. 5.1: Eigenschaften der Virusmutanten bzw. der mutierten Env-Glykoproteine

	Einbau im Kontext von MT-4 und H9	Fusion	Oberfläche	Replikation in		Infektiosität ¹	
				MT-4	H9	MT-4	H9
Wt	+	+	+	+	+	100%	100%
Trunkationen in Env-CT							
Tr712	+	+++	++	+ ²	-	n.d.	n.d.
Tr752	+	++	++	+ ²	-	30-50%	30-50%
Tr752(N750K)	++	+++	++	+	+ ²	100%	100%
Tr813	+	+	+	+ ²	-	n.d.	n.d.
Mutationen in Env-TMD							
TmR-I	+	+	+	+	+ ²	n.d.	n.d.
TmCD22	+	+	+	+	- ³	n.d.	n.d.

¹ Infektiositäten zellfreier Virionen aus MT-4- bzw. H9-Zellen in diversen *single round of infection*-Analysen

² gegenüber pNL-Wt etwas verzögerte Replikation

³ keine bzw. gegenüber pNL-Wt erheblich verzögerte Replikation

n.d. = nicht durchgeführt

Die Daten zeigen deutlich, daß die Virusmutanten mit trunkierten Env-CTs nicht deswegen in H9-Zellen replikationsinkompetent sind, weil die Glykoproteine hinsichtlich der Prozessierung, des Glykoprotein-Einbaus in Virionen, der Fusogenität oder der Zelloberflächenexpression im H9-Kontext gestört sind. Auch ein Defekt in der Freisetzung mutanter Virionen, potentiell vermittelt durch eine aberrante Interaktion der mutierten Glykoproteine mit Matrix, scheidet als Grund für die Replikationsinkompetenz dieser Mutanten in H9-Zellen aus, da mit VSV-G-Pseudotypen infizierte H9-Zellen die gleiche Menge an mutanten Virionen freisetzen wie Wildtyp-Virionen.

Wie im vorangegangenen Kapitel ausgeführt, haben Mutationen in Env-CT nur einen geringen Einfluß auf die Infektiosität zellfreier Virionen, dafür aber wahrscheinlich dramatische Effekte auf die Vermittlung von Zell-Zell-Transmission von HIV-1. An dieser Stelle soll betont werden, daß der Mechanismus der Zell-Zell-Fusion bzw. Synzytienbildung *nicht* gleichzusetzen ist mit dem Mechanismus der Zell-Zell-Adhäsion zum Zweck der Virus-Transmission. Im Kontext der Mutante pNL-Tr753, die der hier analysierten Mutante pNL-Tr752 bezüglich ihrer Länge sehr ähnlich ist, wurde konkret postuliert, daß die Fähigkeit des

Env-Glykoproteins, Synzytienbildung zu induzieren, nicht ausreicht, um replikative Ausbreitung von HIV-1-Virionen zu vermitteln (Helseth *et al.*, 1990a).

Bei dem Vorgang der Zell-Zell-Transmission und der Ausbildung der sogenannten „virologischen Synapse“ (Piguet und Sattentau, 2004) sind mehrere Elemente des Zytoskeletts involviert. So wurde gezeigt, daß für die Ausbildung einer stabilen adhäsiven Verbindung zwischen T-Zellen zum Zweck der Virus-Transmission eine Aktin-abhängige Rekrutierung der HIV-1-Rezeptoren und LFA-1 in der Zielzelle zum Ort des Zell-Zell-Kontakts nötig ist. Für diesen Prozeß sind Polymerisierungsvorgänge von Aktin sowie die Funktionalität des Motor-Proteins Myosin essentiell (Jolly *et al.*, 2004). Einen weiteren Hinweis auf die Involvierung des Zytoskeletts liefert die Tatsache, daß im Kontext von HTLV-1 beim Vorgang der Zell-Zell-Transmission eine Reorganisation des MTOC (*microtubule-organizing center*) in der Effektorzelle beobachtet wurde (Igakura *et al.*, 2003). Möglicherweise können Mikrotubuli auch bei Zell-Zell-Transmission von HIV-1 eine Rolle spielen, was mit der Tatsache in Einklang zu bringen ist, daß HIV-1 Mikrotubuli für seinen intrazellulären Transport benutzt (McDonald *et al.*, 2002).

Mann kann nun spekulieren, daß der HIV-1-Env-CT bei dem Prozeß der Ausbildung der virologischen Synapse und der Reorganisation von Elementen des Zytoskeletts eine Rolle spielt. In diesem Kontext ist es interessant, daß zwei der identifizierten Interaktionspartner des HIV-1-Env-CTs, nämlich α -Catenin und p115-RhoGEF, mit Aktinstrukturen assoziiert bzw. in den Prozeß der Formation von Aktinkabeln involviert sind (siehe 1.5.2.1). Die durch Überexpression von p115-RhoGEF induzierte Formation von Aktinkabeln wurde in Zellen, welche den Env-CT koexprimierten, unterdrückt, und Virusmutanten, in denen die p115-RhoGEF-Bindestelle in Env-CT mutiert war, waren replikationsinkompetent (Zhang *et al.*, 1999). Somit wäre der Zelltyp-abhängige Defekt von Virusmutanten mit trunkierten Env-CTs darauf zurückzuführen, daß es in Zellsystemen, in welchen sich HIV-1 hauptsächlich durch Zell-Zell-Transmission ausbreitet, durch Fehlen des Env-CTs zu keiner Reorganisation des Zytoskeletts und damit zu keiner Ausbildung stabiler adhäsiver Zell-Zell-Verbindungen kommen kann, die für die erfolgreiche Zell-Zell-Transmission von HIV-1 benötigt werden. Allerdings muß zunächst geklärt werden, ob sich dieses anhand von pNL-Tr752 entwickelte Modell auf mehrere Virusmutanten mit trunkierten Env-CTs ausweiten läßt.

Da eine Involvierung des Env-CTs beim Prozeß der Zell-Zell-Transmission von HIV-1 bisher nicht beschrieben wurde, hat die Arbeit möglicherweise einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Rolle dieser *in vivo* streng konservierten Region geleistet. Zukünftige Untersuchungen werden in die Richtung gehen, die potentielle Rolle des Env-CTs bei diesem Prozeß genauer zu analysieren.

6. ANHANG

6.1 Oligonukleotide

In der folgenden Tabelle sind alle innerhalb dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgelistet. Sofern die Oligonukleotide von Sequenzen des HIV-1-Klons BH10 (Ratner *et al.*, 1987) abgeleitet sind, ist die jeweilige Position angegeben. Einzelne mutagenisierende Nukleotidveränderungen oder Sequenzen, welche nicht von BH10 abstammen, sind fett gedruckt.

Nr.	Sequenz 5' → 3'	Position BH10	Orientierung	Beschreibung
1	GCAGAGAGAAAA AAGAGCAGTG	7771-7792	Sinn	Amplifizierung und Sequenzierung proviraler pNL-TmCD22-DNA (4.3.1)
18	GGTGGAGAGA GAGACAGA	8462-8479	Sinn	Sequenzierung (<i>env</i>)
23	AGAGCAAGAAAC GGAGCCAGTA	5853-5874	Sinn	Amplifizierung und Sequenzierung proviraler pNL-TmCD22-DNA (4.3.1); der in der Sequenz enthaltene <i>mismatch</i> ist hier nicht von Bedeutung
30	TAATTAGATC AGCCAATTTCA	7065-7085	Sinn	Generierung von pNL-TmR-I (6.2.1) und pNL-Tr752(N750K) (6.2.2); der in der Sequenz enthaltene <i>mismatch</i> ist hier nicht von Bedeutung.
38	TACCTGAGGT CTGAGTGGAA	9047-9028	Gegensinn	Sequenzierung (<i>env</i>), Generierung von pWPI-Env-TMD-CT (6.2.3)
43	GTAGGTTTAA TAATAGTTTTT	8330-8350	Sinn	Generierung von pNL-TmR-I (6.2.1), führt eine Punktmutation (R696I) in die TM-Region von gp160 ein
43rev	AAAAACTATT ATTAAACCTAC	8350-8330	Gegensinn	Generierung von pNL-TmR-I (6.2.1), führt eine Punktmutation (R696I) in die TM-Region von gp160 ein
71	CTTCTAGGTATGT GGCGAATAGCTC	8791-8766	Gegensinn	Generierung von pNL-TmR-I (6.2.1) und pNL-Tr752(N750K) (6.2.2), Sequenzierung (<i>env</i>)

Nr.	Sequenz 5' → 3'	Position BH10	Orientierung	Beschreibung
81	CTCTGGAACA GATTTGGA	8106-8123	Sinn	Amplifizierung und Sequenzierung proviraler pNL-TmCD22-DNA (4.3.1), Sequenzierung (<i>env</i>)
278	CGATTAGTGAAA GGATCCTAAGC	8492-8514	Sinn	Generierung pNL-Tr752(N750K) (6.2.2), führt sowohl ein Stop-Kodon (As-Position 753) als auch einen Aminosäureaustausch (N zu K) an As-Position 750 ein.
279	GCTTAGGATCCT TTCATAATCG	8514-8492	Gegensinn	Generierung pNL-Tr752(N750K) (6.2.2), führt sowohl ein Stop-Kodon (As-Position 753) als auch einen Aminosäureaustausch (N zu K) an As-Position 750 ein.
280	<u>CTTCGTTTCGCC</u> <u>CAGCCAGGAAAT</u> <u>CCATGCCCCGATT</u> <u>CAGAAGAGGAG</u> <u>CCAGAACAGAAA</u> <u>TAAAATTATTCAT</u> <u>AATGATAGTA</u>		Sinn	Erstes Oligo bei der Generierung von pWPI-Env-TMD-CT (6.2.3), überlappt 24 Nukleotide mit der BH10-Sequenz (ab Position 8297 bis Position 8320) und mit 20 Nukleotiden von Oligo 281 (jeweils unterstrichen)
281	<u>GCGTCTAGAATG</u> <u>GATGCAATGAAG</u> <u>AGAGGGCTCTGC</u> <u>TGTGTGCTGCTG</u> <u>CTGTGTGGAGCA</u> <u>GTCTTCGTTTCG</u> <u>CCCAGCCAGG</u>		Sinn	Zweites Oligo bei der Generierung von pWPI-Env-TMD-CT (6.2.3), überlappt 20 Nukleotide mit der Sequenz von Oligo 280 (unterstrichen) und enthält eine <i>Xba</i> I-Schnittstelle (kursiv)
286	GAGGGCTTCC CACCCCCTGCG	8632-8612	Gegensinn	Amplifizierung und Sequenzierung proviraler pNL-TmCD22-DNA (4.3.1), Sequenzierung (<i>env</i>)
319	GACAGCGACGAA GACCTCCTC	6020-6040	Sinn	Amplifizierung und Sequenzierung proviraler pNL-TmCD22-DNA (4.3.1).
320	GTGCTTCCTG CTGCTCCAAG	7839-7819	Gegensinn	Amplifizierung und Sequenzierung proviraler pNL-TmCD22-DNA (4.3.1), Sequenzierung (<i>env</i>)
321	GTTGTGTGGTCC ATAGTAATC	6151-6171	Sinn	Sequenzierung (<i>env</i>)

Nr.	Sequenz 5' → 3'	Position BH10	Orientierung	Beschreibung
322	GATCAAAGCCTA AAGCCATGT	6590-6610	Sinn	Sequenzierung (<i>env</i>)
322	GGAATTAGGCCA GTAGTATCA	7001-7021	Sinn	Sequenzierung (<i>env</i>)
324	GATCTGAGCCTG GGAGCTCTC	471-491	Sinn	Sequenzierung (<i>matrix</i>)
325	CCTGCTATGTCA CTTCCCCTT	1499-1479	Gegensinn	Sequenzierung (<i>matrix</i>)
326	GAGATCCCTCAG ACCCTTTTA	588-608	Sinn	Sequenzierung (<i>matrix</i>)
327	CTGCAGCTTCCT CATTGATGG	1417-1397	Gegensinn	Sequenzierung (<i>matrix</i>)

6.2 Klonierungsstrategien

Die hier verwendeten Methoden wie z.B. PCR-Protokolle oder der Umgang mit Plasmid-DNA sind im Methodenteil (Kapitel 3) detailliert beschrieben. Alle Nukleotid-Nummerierungen beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf die Sequenz des molekularen HIV-1-Klons BH10 (Ratner *et al.*, 1987). Die Sequenzen aller verwendeten Oligonukleotide sind in Kapitel 6.1 zu finden.

6.2.1 Generierung von pNL-TmR-I

Wie in 4.1 beschrieben, wurden bei der Sequenzierung von pNL-TmR-I kurz vor der Punktmutation, welche zum gewünschten Aminosäureaustausch von Arginin zu Isoleucin führen sollte (Position 8340: G → T), zwei weitere Punktmutationen an folgenden Stellen detektiert, die im Leserahmen von *env* zu folgenden Aminosäureaustauschen führten:

Position 8265: A → G, Asparagin → Serin

Position 8267: T → A, Tryptophan → Arginin

Aus diesem Grund wurde die Mutante pNL-TmR-I mittels Fusions-PCR (siehe 3.2.12.2) neu generiert, wobei pNL-Wt als Vorlage diente.

Konditionen der PCRs zur Generierung der Fusionsprodukte:

- (1) *upstream-Primer* 30 (Sinn), mutagenisierender *downstream-Primer* 43rev (Gegensinn), *annealing*-Temperatur: 57°C, Größe Produkt 1 = 1286 bp.
- (2) mutagenisierender *upstream-Primer* 43 (Sinn), *downstream-Primer* 71 (Gegensinn), *annealing*-Temperatur: 57°C, Größe Produkt 2 = 462 bp.

Fusions-PCR:

mit den Produkten 1 und 2 der ersten beiden PCRs, *annealing*-Temperatur 46°C, Produktgröße = 1727 bp.

Verdau und Klonierung des erhaltenen Fusions-PCR-Produkts

Das aufgereinigte DNA-Fragment (siehe 3.2.10) wurde mit *Bsa*BI und *Bam*HI verdaut (siehe 3.2.5) (Größe: 919 bp) und gegen das entsprechende Fragment im Plasmid pNL-TmCD22, welches ebenfalls mit *Bsa*BI und *Bam*HI verdaut und mit Kälberdarmphosphatase (CIP) (siehe 3.2.6) behandelt wurde, ausgetauscht. Dieses HIV-1-Expressionsplasmid kodiert im Env-Gen für die Transmembran-Region von CD22 statt für die homologe Transmembran-Region und besitzt daher innerhalb des *Bsa*BI-*Bam*HI-Schnittbereichs eine zusätzliche *Xcm*I-Schnittstelle. Dadurch war es möglich, erfolgreiche Klonierungen (fehlende zusätzliche *Xcm*I-Schnittstelle) mittels Restriktionsverdau zu identifizieren. Das neu generierte Plasmid pNL-TmR-I wurde außerdem zur Bestätigung der eingeführten Mutation sequenziert.

6.2.2 Generierung von pNL-Tr752(N750K)

Wie in 4.3.2 beschrieben, wurde in pNL-Tr752 eine zweite Punktmutation eingefügt, was zur Generierung von pNL-Tr752(N750K) führte. Dieses ist ein pNL-Derivat, welches sowohl ein verkürztes Env-Protein als auch einen Aminosäureaustausch an Position 750 von Asparagin zu Lysin besitzt (N750K).

Diese Mutation wurde mittels Fusions-PCR (siehe 3.2.12.2) eingefügt:

Konditionen der PCRs zur Generierung der Fusionsprodukte:

- (1) *upstream-Primer* 30 (Sinn), mutagenisierender *downstream-Primer* 279 (Gegensinn), *annealing*-Temperatur: 57°C, Größe Produkt 1 = 1450 bp.
- (2) mutagenisierender *upstream-Primer* 278 (Sinn), *downstream-Primer* 71 (Gegensinn), *annealing*-Temperatur: 57°C, Größe Produkt 2 = 300 bp.

Fusions-PCR:

mit den Produkten 1 und 2 der ersten beiden PCRs, *annealing*-Temperatur 46°C, Produktgröße = 1727 bp.

Verdau und Klonierung des erhaltenen Fusions-PCR-Produkts

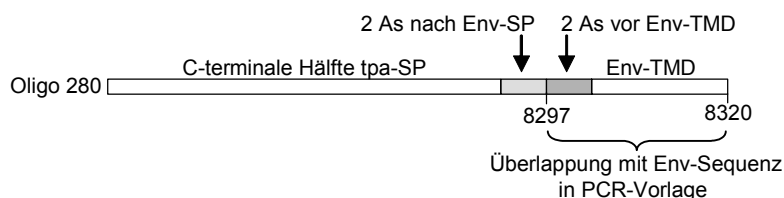
Das aufgereinigte DNA-Fragment (siehe 3.2.10) wurde mit *Bsa*BI und *Bam*HI verdaut (siehe 3.2.5) (Größe: 919 bp) und gegen das entsprechende Fragment in Plasmid pNL-Tr752, welches ebenfalls mit *Bsa*BI und *Bam*HI verdaut und mit Kälberdarmphosphatase (CIP) behandelt wurde (siehe 3.2.6), ausgetauscht. Da keine eindeutige Identifizierung durch Restriktionsschnittanalyse möglich war, wurden mehrere Klone des Ligationsansatzes zur Bestätigung der eingeführten Mutation sequenziert.

6.2.3 Generierung von pWPI-Env-TMD-CT

Zur Generierung des bizistronischen lentiviralen Vektors pWPI-Env-TMD-CT, der sowohl für den membrangebundenen Env-CT als auch für GFP als Transgene kodiert, wurde das Signalpeptid von tpa (*tissue plasminogen activator*) in zwei aufeinanderfolgende PCRs an Env-CT fusioniert und das resultierende Konstrukt in den linearisierten Vektor pWPI eingefügt.

Bedingungen 1. PCR

Durch eine erste PCR sollte die C-terminale Hälfte des tpa-Signalpeptids an den Transmembrananker und C-Terminus von Env fusioniert werden. Dafür wurde das Oligonukleotid 280 benutzt, welches im folgenden schematisch dargestellt ist:



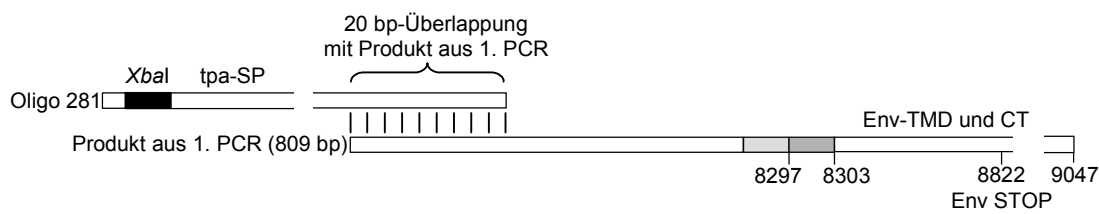
Die ersten 52 Nukleotide des Oligonukleotides kodieren für die C-terminale Hälfte des tpa-Signalpeptids, gefolgt von 6 Nukleotiden, welche für die zwei Aminosäuren Threonin (T) und Glutaminsäure (E) kodieren (hellgrau). Dann folgen die Sequenzen für die zwei Aminosäuren Isoleucin (I) und Lysin (K) (dunkelgrau), welche direkt vor dem Transmembrananker von Env

liegen, und ab hier entspricht die Sequenz des Oligonukleotids auch der Sequenz von BH10 (ab Nukleotid 8297 bis Nukleotid 8320).

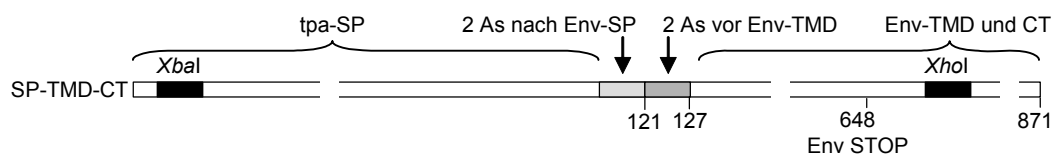
Dieses Oligonukleotid diente in der ersten PCR als *upstream-Sinn-Primer*, als *downstream-Gegensinn-Primer* wurde Oligonukleotid 30 gewählt (Nukleotide 9047-9028). Vorlage für die PCR war ein Expressionsplasmid für HIV-1-Env (p β -AKenv/neo). Die *annealing*-Temperatur betrug 57°C, das entstandene Produkt hatte eine Größe von 809 Basenpaaren und wurde dann in der zweiten PCR als Vorlage verwendet.

Bedingungen 2. PCR

In der zweiten PCR wurde der Rest des tpa-Signalpeptids an das Produkt aus der ersten PCR fusioniert. Hierfür wurde das Oligonukleotid 281 verwendet, welches in einer Sequenz von 20 Nukleotiden mit dem Produkt aus der ersten PCR überlappt:



Sowohl das Oligonukleotid als auch das Produkt der ersten PCR sind nicht maßstabsgetreu gezeichnet, in beiden Produkten ist aus Platzgründen die Sequenz unterbrochen. Das Oligonukleotid 281, welches am N-Terminus eine XbaI-Schnittstelle enthält, direkt gefolgt vom Startkodon ATG des tpa-Signalpeptids, wurde dann in einer zweiten PCR als *upstream-Sinn-Primer* eingesetzt, als *downstream-Gegensinn-Primer* fungierte wiederum Oligonukleotid 38. Als Vorlage in dieser PCR diente das Produkt der ersten PCR, die *annealing*-Temperatur betrug 57°C. Das resultierende 871 bp große Produkt SP-TMD-CT, welches nun die vollständige kodierende Sequenz für das tpa-Signalpeptid als auch für den membrangebundenen Env-C-Terminus beinhaltet, ist im folgenden dargestellt:



Verdau und Klonierung des Konstrukts SP-TMD-CT in pWPI

Nach Aufreinigung (siehe 3.2.10) und Verdau von SP-TMD-CT (XbaI, mit Oligonukleotid 281 eingefügt, und XhoI, eine homologe Restriktionsschnittstelle der Sequenz von BH10, die

zwischen dem Env-Stop-Kodon und dem Ende des Konstrukts liegt) (siehe 3.2.5) erfolgte nach erneuter Aufreinigung ein Auffüllen der 5'-Überhänge der geschnittenen Enden (siehe 3.2.7). Anschließend wurde das Fragment durch Ligation in den mit *PmeI* linearisierten und mit Kälberdarmphosphatase (CIP) (siehe 3.2.6) behandelten Vektor pWPI eingebracht.

Die richtige Orientierung des Fragments im Vektor wurde durch Verdau mit den beiden Enzymen *Bpu1102I* und *ClaI* bestätigt: bei korrekter Orientierung sollten Fragmente der Größe 2182 und 9669 bp und bei falscher Orientierung der Größe 1503 und 10348 entstehen.

6.3 Abkürzungen

α	anti
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
Amp	Ampicillin
AP	Außen-Primer
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AZT	Azidothymidin
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CA	Kapsid-Protein (<i>capsid</i>)
CAEV	<i>caprine arthritis-encephalitis virus</i>
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CCR5	<i>chemokine receptor 5</i>
CIP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
cm	Zentimeter
CMV	<i>cytomegalovirus</i>
cPPT	<i>central polypurine tract</i>
CT	C-Terminus
CXCR4	<i>chemokine receptor 4</i>
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF1 α	<i>Elongation factor 1α</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EIAV	<i>equine infectious anemia virus</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMCV	<i>encephalomyocarditis virus</i>
Env	Virales Hüllglykoprotein (<i>envelope</i>)
EP	Elektrophorese
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FIV	<i>feline immunodeficiency virus</i>
FP	Fusions-Primer
g	Gramm
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
GFP	grün fluoreszierendes Protein
gp	Glykoprotein
gt	Ziege (<i>goat</i>)
h	Stunde
HBS	HEPES <i>buffered saline</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HPS	Heparansulfat
HTLV	<i>human T-cell leukemia virus</i>
hu	<i>human</i>
IE	<i>immediate early</i>
IF	Immunfluoreszenz
IL-2	Interleukin 2
IN	Integrase
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
IU	<i>infectious units</i>
k	Kilo bzw. komplett
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LB	Luria-Broth
LLP	<i>lentiviral lytic peptide</i>
LP	Laufpuffer
LTR	<i>long terminal repeat</i>
LZ	<i>leucine zipper</i>
μ	mikro
m	milli
M	molar
MA	Matrix-Protein
MAGI	<i>multinuclear activation of a galactosidase indicator</i>
MG	Molekulargewicht
min	Minute
mo	Maus (<i>mouse</i>)
MoMLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
MPMV	<i>Mason-Pfizer monkey virus</i>
MuLV	<i>murine leukemia virus</i>
MVV	Maedi-Visna-Virus

n	nano
NC	Nukleokapsid-Protein (<i>nucleocapsid</i>)
NHS	N-Hydrosuccinimid
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
p	Plasmid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
PIC	<i>preintegration complex</i>
pol	Polymerase-Gen
POX	Peroxidase
PP	Polypropylen
Pr	<i>precursor</i>
PR	Protease
PS	Polystyrol
P/S	Penicillin/Streptomycin
rb	<i>rabbit</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>
RRE	<i>rev response element</i>
RSV	Rous-Sarkom-Virus
RT	Reverse Transkriptase bzw. Raumtemperatur
SB	<i>sample buffer</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sek.	Sekunde
SIN	<i>self-inactivating</i>
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
s.o.	siehe oben
SP	Signalpeptid
Tab.	Tabelle
TAR	<i>Trans-activation response</i>
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMD	Transmembrandomäne
tpa	<i>tissue plaminogen activator</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TZ	Tischzentrifuge
U	<i>unit</i>
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
VE	voll entsalzt
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>
VSV-G	Glykoprotein des <i>vesicular stomatitis virus</i>
WB	Western Blot

WHO	<i>world health organization</i>
WPRE	<i>woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element</i>
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen-Verhältnis
w/w	Gewicht/Gewicht-Verhältnis
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

7. LITERATUR

- Abacioglu, Y.H., Fouts, T.R., Laman, J.D., Claassen, E., Pincus, S.H., Moore, J.P., Roby, C.A., Kamin-Lewis, R. und Lewis, G.K. (1994).** Epitope mapping and topology of baculovirus-expressed HIV-1 gp160 determined with a panel of murine monoclonal antibodies. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10(4)**, 371-381.
- Adachi, A., Gendelman, H.E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A. und Martin, M.A. (1986).** Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* **59(2)**, 284-291.
- Aguilar-Cordova, E., Chinen, J., Donehower, L., Lewis, D.E. und Belmont, J.W. (1994).** A sensitive reporter cell line for HIV-1 tat activity, HIV-1 inhibitors, and T cell activation effects. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10(3)**, 295-301.
- Akari, H., Fukumori, T. und Adachi, A. (2000).** Cell-dependent requirement of human immunodeficiency virus type 1 gp41 cytoplasmic tail for Env incorporation into virions. *J. Virol.* **74(10)**, 4891-4893.
- Allan, J.S., Coligan, J.E., Barin, F., McLane, M.F., Sodroski, J.G., Rosen, C.A., Haseltine, W.A., Lee, T.H. und Essex, M. (1985).** Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III. *Science* **228(4703)**, 1091-1094.
- Andreassen, H., Bohr, H., Bohr, J., Brunak, S., Bugge, T., Cotterill, R.M., Jacobsen, C., Kusk, P., Lautrup, B., Petersen, S.B., Saermark, T. und Ulrich, K. (1990).** Analysis of the secondary structure of the human immunodeficiency virus (HIV) proteins p17, gp120, and gp41 by computer modeling based on neural network methods. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **3(6)**, 615-622.
- Azran, I., Schavinsky-Khrapunsky, Y. und Aboud, M. (2004).** Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. *Retrovirology* **1(1)**, 20.
- Baltimore, D. (1970).** RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature* **226(252)**, 1209-1211.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. und Montagnier, L. (1983).** Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220(4599)**, 868-871.
- Beary, T.P., Tencza, S.B., Mietzner, T.A. und Montelaro, R.C. (1998).** Interruption of T-cell signal transduction by lentivirus lytic peptides from HIV-1 transmembrane protein. *J. Pept. Res.* **51(1)**, 75-59.
- Berlioz-Torrent, C., Shacklett, B.L., Erdtmann, L., Delamarre, L., Bouchaert, I., Sonigo, P., Dokhelar, M.C. und Benarous, R. (1999).** Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins. *J. Virol.* **73(2)**, 1350-1361.
- Bess, J.W. Jr., Gorelick, R.J., Bosche, W.J., Henderson, L.E. und Arthur, L.O. (1997).** Microvesicles are a source of contaminating cellular proteins found in purified HIV-1 preparations. *Virology* **230(1)**, 134-144.
- Bittner, J.J. (1936).** Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science* **84**, 162-166.
- Boge, M., Wyss, S., Bonifacino, J.S. und Thali, M. (1998).** A membrane-proximal tyrosine-based signal mediates internalization of the HIV-1 envelope glycoprotein via interaction with the AP-2 clathrin adaptor. *J. Biol. Chem.* **273(25)**, 15773-15778.

- Bosch, V. und Pawlita, M. (1990).** Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 env gene product proteolytic cleavage site. *J. Virol.* **64(5)**, 2337-2344.
- Brasseur, R., Cornet, B., Burny, A., Vandenbranden, M. und Ruyschaert, J.M. (1988).** Mode of insertion into a lipid membrane of the N-terminal HIV gp41 peptide segment. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **4(2)**, 83-90.
- Brun-Vezinet, F., Rey, M.A., Katlama, C., Girard, P.M., Roulot, D., Yeni, P., Lenoble, L., Clavel, F., Alizon, M. und Gadelles, S. (1987).** Lymphadenopathy-associated virus type 2 in AIDS and AIDS-related complex. Clinical and virological features in four patients. *Lancet* **1(8525)**, 128-132.
- Bryant, M. und Ratner, L. (1990).** Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87(2)**, 523-527.
- Bukrinsky, M.I., Haggerty, S., Dempsey, M.P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M. und Stevenson, M. (1993).** A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* **365(6447)**, 666-669.
- Centers for Disease Control (1981).** *Pneumocystis Pneumonia* - Los Angeles. *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.* **30(21)**, 250-252.
- Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M. und Kim, P.S. (1997).** Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89(2)**, 263-273.
- Chan, D.C. und Kim, P.S. (1998).** HIV entry and its inhibition. *Cell* **93(5)**, 681-684.
- Chan, W.E., Wang, Y.L., Lin, H.H. und Chen, S.S. (2004).** Effect of extension of the cytoplasmic domain of human immunodeficiency type 1 virus transmembrane protein gp41 on virus replication. *J. Virol.* **78(10)**, 5157-5169.
- Chen, S.S., Lee, S.F. und Wang, C.T. (2001).** Cellular membrane-binding ability of the C-terminal cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope transmembrane protein gp41. *J. Virol.* **75(20)**, 9925-9938.
- Chernomordik, L., Chanturiya, A.N., Suss-Toby, E., Nora, E. und Zimmerberg, J. (1994).** An amphipathic peptide from the C-terminal region of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein causes pore formation in membranes. *J. Virol.* **68(11)**, 7115-7123.
- Chesebro, B., Wehrly, K., Nishio, J. und Perryman, S. (1992).** Macrophage-tropic human immunodeficiency virus isolates from different patients exhibit unusual V3 envelope sequence homogeneity in comparison with T-cell-tropic isolates: definition of critical amino acids involved in cell tropism. *J. Virol.* **66(11)**, 6547-6554.
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C. und Rouzioux, C. (1986).** Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233(4761)**, 343-346.
- Clavel, F. und Orenstein, J.M. (1990).** A mutant of human immunodeficiency virus with reduced RNA packaging and abnormal particle morphology. *J. Virol.* **64(10)**, 5230-5234.
- Cleveland, S.M., McLain, L., Cheung, L., Jones, T.D., Hollier, M. und Dimmock, N.J. (2003).** A region of the C-terminal tail of the gp41 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 contains a neutralizing epitope: evidence for its exposure on the surface of the virion. *J. Gen. Virol.* **84(Pt 3)**, 591-602.
- Coffin, J.M. (1996).** The viruses and their replication. In: Field, B.N., Knipe, D.M. und Howley, P.M. (Hrsg.). *Fields Virology*, 1767-1847. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pennsylvania, USA.

- Cohen, E.A., Dehni, G., Sodroski, J.G. und Haseltine, W.A. (1990).** Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J. Virol.* **64(6)**, 3097-3099.
- Colman, P.M. und Lawrence, M.C. (2003).** The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4(4)**, 309-319.
- Cossart, P. und Sansonetti, P.J. (2004).** Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304(5668)**, 242-248.
- Cosson, P. (1996).** Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *EMBO J.* **15(21)**, 5783-5788.
- Cullen, B.R. (1998).** Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways. *Virology* **249(2)**, 203-210.
- David, G., Bai, X.M., Van der Schueren, B., Cassiman, J.J. und Van den Berghe, H. (1992).** Developmental changes in heparan sulfate expression: in situ detection with mAbs. *J. Cell Biol.* **119(4)**, 961-975.
- Derdeyn, C.A., Decker, J.M., Sfakianos, J.N., Wu, X., O'Brien, W.A., Ratner, L., Kappes, J.C., Shaw, G.M. und Hunter, E. (2000).** Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to the fusion inhibitor T-20 is modulated by coreceptor specificity defined by the V3 loop of gp120. *J. Virol.* **74(18)**, 8358-8367.
- Doms, R.W. und Trono, D. (2000).** The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. *Gen. Dev.* **14(21)**, 2677-2688.
- Dubay, J.W., Roberts, S.J., Hahn, B.H. und Hunter, E. (1992).** Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain blocks virus infectivity. *J. Virol.* **66(11)**, 6616-6625.
- Dustin, M.L. und Springer, T.A. (1988).** Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J. Cell Biol.* **107(1)**, 321-331.
- Earl, P.L., Doms, R.W. und Moss, B. (1990).** Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87(2)**, 648-652.
- Earl, P.L., Koenig, S. und Moss, B. (1991a).** Biological and immunological properties of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: analysis of proteins with truncations and deletions expressed by recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.* **65(1)**, 31-41.
- Earl, P.L., Moss, B. und Doms, R.W. (1991b).** Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Virol.* **65(4)**, 2047-2055.
- Earl, P.L. und Moss, B. (1993).** Mutational analysis of the assembly domain of the HIV-1 envelope glycoprotein. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **9(7)**, 589-594.
- Edwards, T.G., Wyss, S., Reeves, J.D., Zolla-Pazner, S., Hoxie, J.A., Doms, R.W. und Baribaud, F. (2002).** Truncation of the cytoplasmic domain induces exposure of conserved regions in the ectodomain of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Virol.* **76(6)**, 2683-2691.
- Ellerman, V. und Bang, O. (1908).** Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig.* **46**, 595-609.
- Emerman, M. (1996).** HIV-1, Vpr and the cell cycle. *Curr. Biol.* **6(9)**, 1096-1103.

Endres, M.J., Clapham, P.R., Marsh, M., Ahuja, M., Turner, J.D., McKnight, A., Thomas, J.F., Stoeckenau-Haggarty, B., Choe, S., Vance, P.J., Wells, T.N., Power, C.A., Sutterwala, S.S., Doms, R.W., Landau, N.R. und Hoxie, J.A. (1996). CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* **87**(4), 745-756.

Evans, D.T., Tillman, K.C. und Desrosiers, R.C. (2002). Envelope glycoprotein cytoplasmic domains from diverse lentiviruses interact with the prenylated Rab acceptor. *J. Virol.* **76**(1), 327-337.

Fischer, U., Meyer, S., Teufel, M., Heckel, C., Luhrmann, R. und Rautmann, G. (1994). Evidence that HIV-1 Rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA. *EMBO J.* **13**(17), 4105-4112.

Fortin, J.F., Cantin, R., Lamontagne, G. und Tremblay, M. (1997). Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J. Virol.* **71**(5), 3588-3596.

Fortin, J.F., Cantin, R. und Tremblay, M. (1998). T cells expressing activated LFA-1 are more susceptible to infection with human immunodeficiency virus type 1 particles bearing host-encoded ICAM-1. *J. Virol.* **72**(3), 2105-2112.

Freed, E.O., Myers, D.J. und Risser, R. (1990). Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**(12), 4650-4654.

Freed, E.O. und Martin, M.A. (1995). Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix. *J. Virol.* **69**(3), 1984-1989.

Freed, E.O. und Martin, M.A. (1996). Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J. Virol.* **70**(1), 341-351.

Friedman-Kien, A.E., Laubenstein, L.J., Rubinstein, P., Buimovici-Klein, E., Marmor, M., Stahl, R., Spigland, I., Kim, K.S. und Zolla-Pazner, S. (1982). Disseminated Kaposi's sarcoma in homosexual men. *Ann. Intern. Med.* **96**(6), 693-700.

Furuta, R.A., Wild, C.T., Weng, Y. und Weiss, C.D. (1998). Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nat. Struct. Biol.* **5**(4), 276-279. [Erratum in *Nat. Struct. Biol.* **5**(7), 612 (1998).]

Gabuzda, D.H., Lever, A., Terwilliger, E. und Sodroski, J. (1992). Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J. Virol.* **66**(6), 3306-3315.

Gallaheer, W.R., Ball, J.M., Garry, R.F., Griffin, M.C. und Montelaro, R.C. (1989). A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **5**(4), 431-440.

Gallay, P., Hope, T., Chin, D. und Trono, D. (1997). HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**(18), 9825-9830.

Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J. und Safai, B. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**(4648), 500-503.

Gallo, S.A., Finnegan, C.M., Viard, M., Raviv, Y., Dimitrov, A., Rawat, S.S., Puri, A., Durell, S. und Blumenthal, R. (2003). The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim. Biophys. Acta* **1614**(1), 36-50.

Ganesh, L., Leung, K., Lore, K., Levin, R., Panet, A., Schwartz, O., Koup, R.A. und Nabel, G.J. (2004). Infection of specific dendritic cells by CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 promotes cell-mediated transmission of virus resistant to broadly neutralizing antibodies. *J. Virol.* **78(21)**, 11980-11987.

Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Cote, M., Rich, R.L., Myszka, D.G. und Sundquist, W.I. (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107(1)**, 55-65.

Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., Figdor, C.G. und van Kooyk, Y. (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100(5)**, 587-597.

Gelderblom, H.R. (1991). Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* **5(6)**, 617-638.

Geyer, M., Fäckler, O.T. und Peterlin, B.M. (2001). Structure-function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep.* **2(7)**, 580-585.

Gluschankof, P., Mondor, I., Gelderblom, H.R. und Sattentau, Q.J. (1997). Cell membrane vesicles are a major contaminant of gradient-enriched human immunodeficiency virus type-1 preparations. *Virology* **230(1)**, 125-133.

Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A. und Saxon, A. (1981). *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **305(24)**, 1425-1431.

Göttlinger, H.G., Sodroski, J.G. und Haseltine, W.A. (1989). Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86(15)**, 5781-5785.

Granowitz, C., Colicelli, J. und Goff, S.P. (1991). Analysis of mutations in the envelope gene of Moloney murine leukemia virus: separation of infectivity from superinfection resistance. *Virology* **183(2)**, 545-554.

Gupta, P., Balachandran, R., Ho, M., Enrico, A. und Rinaldo, C. (1989). Cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus type 1 in the presence of azidothymidine and neutralizing antibody. *J. Virol.* **63(5)**, 2361-2365.

Haffar, O.K., Dowbenko, D.J. und Berman, P.W. (1991). The cytoplasmic tail of HIV-1 gp160 contains regions that associate with cellular membranes. *Virology* **180(1)**, 439-441.

Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H.D. und Garten, W. (1992). Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **360(6402)**, 358-361.

Harada, S., Koyanagi, Y. und Yamamoto, N. (1985). Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* **229(4713)**, 563-566.

Heinzinger, N.K., Bukinsky, M.I., Haggerty, S.A., Ragland, A.M., KewalRamani, V., Lee, M.A., Gendelman, H.E., Ratner, L., Stevenson, M. und Emerman, M. (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91(15)**, 7311-7315.

Helseth, E., Kowalski, M., Gabuzda, D., Olshevsky, U., Haseltine, W. und Sodroski, J. (1990a). Rapid complementation assays measuring replicative potential of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein mutants. *J. Virol.* **64(5)**, 2416-2420.

- Helseth, E., Olshevsky, U., Gabuzda, D., Ardman, B., Haseltine, W. und Sodroski, J. (1990b).** Changes in the transmembrane region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein affect membrane fusion. *J. Virol.* **64**(12), 6314-6318.
- Helseth, E., Olshevsky, U., Furman, C. und Sodroski, J. (1991).** Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J. Virol.* **65**(4), 2119-2123.
- Henriksson, P. und Bosch, V. (1998).** Inhibition of cellular glycoprotein incorporation into human immunodeficiency virus-like particles by coexpression of additional cellular interaction partner. *Virology* **251**(1), 16-21.
- Hirsch, V.M., Edmondson, P., Murphey-Corb, M., Arbeille, B., Johnson, P.R. und Mullins, J.I. (1989).** SIV adaptation to human cells. *Nature* **341**(6243), 573-574.
- Hunter, E. und Swanstrom, R. (1990).** Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **157**, 187-253.
- Igakura, T., Stinchcombe, J.C., Goon, P.K., Taylor, G.P., Weber, J.N., Griffiths, G.M., Tanaka, Y., Osame, M. und Bangham, C.R. (2003).** Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* **299**(5613), 1713-1716.
- Ishikawa, H., Sasaki, M., Noda, S. und Koga, Y. (1998).** Apoptosis induction by the binding of the carboxyl terminus of human immunodeficiency virus type 1 gp160 to calmodulin. *J. Virol.* **72**(8), 6574-6580.
- Iwatani, Y., Ueno, T., Nishimura, A., Zhang, X., Hattori, T., Ishimoto, A., Ito, M. und Sakai, H. (2001).** Modification of virus infectivity by cytoplasmic tail of HIV-1 TM protein. *Virus Res.* **74**(1-2), 75-87.
- Jacks, T., Power, M.D., Masiaz, F.R., Luciw, P.A., Barr, P.J. und Varmus, H.E. (1988).** Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**(6153), 280-283.
- Jeang, K.T., Widen, S.G., Semmes, O.J. 4th und Wilson, S.H. (1990).** HTLV-I trans-activator protein, tax, is a trans-repressor of the human beta-polymerase gene. *Science* **247**(4946), 1082-1084.
- Jeang, K.T., Derse, D., Matocha, M. und Sharma, O. (1997).** Expression status of Tax protein in human T-cell leukemia virus type 1-transformed MT4 cells: recall of MT4 cells distributed by the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. *J. Virol.* **71**(9), 6277-6278.
- Johnson, D.C. und Huber, M.T. (2002).** Directed egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread. *J. Virol.* **76**(1), 1-8.
- Jolly, C., Kashefi, K., Hollinshead, M. und Sattentau, Q.J. (2004).** HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *J. Exp. Med.* **199**(2), 283-293.
- Jones, K.A., Kadonaga, J.T., Luciw, P.A. und Tjian, R. (1986).** Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. *Science* **232**(4751), 755-759.
- Jones, D.R., Suzuki, K. und Piller, S.C (2002).** A 100-amino acid truncation in the cytoplasmic tail of glycoprotein 41 in the reference HIV type 1 strain RF. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **18**(7), 513-517.
- Jordan, A., Defechereux, P. und Verdin, E. (2001).** The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J.* **20**(7), 1726-1738.
- Jowett, J.B., Planelles, V., Poon, B., Shah, N.P., Chen, M.L. und Chen, I.S. (1995).** The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J. Virol.* **69**(10), 6304-6313.

- Karageorgos, L., Li, P. und Burrell, C. (1993).** Characterization of HIV replication complexes early after cell-to-cell infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **9(9)**, 817-823.
- Kestler, H.W., Ringler, D.J., Mori, K., Panicali, D.L., Sehgal, P.K., Daniel, M.D. und Desrosiers, R.C. (1991).** Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* **65(4)**, 651-662.
- Kiernan, R., Marshall, J., Bowers, R., Doherty, R. und McPhee, D. (1990).** Kinetics of HIV-1 replication and intracellular accumulation of particles in HTLV-I-transformed cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **6(6)**, 743-752.
- Kim, E.M., Lee, K.H. und Kim, J.W. (1999).** The cytoplasmic domain of HIV-1 gp41 interacts with the carboxyl-terminal region of alpha-catenin. *Mol. Cells* **9(3)**, 281-285.
- Kim, J.T., Kim, E.M., Lee, K.H., Choi, J.E., Jhun, B.H. und Kim, J.W. (2002).** Leucine zipper domain of HIV-1 gp41 interacted specifically with alpha-catenin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291(5)**, 1239-1244.
- Kimpton, J. und Emerman, M. (1992).** Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene. *J. Virol.* **66(4)**, 2232-2239.
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J.C. und Montagnier, L. (1984).** T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312(5996)**, 767-768.
- Kliger, Y. und Shai, Y. (1997).** A leucine zipper-like sequence from the cytoplasmic tail of the HIV-1 envelope glycoprotein binds and perturbs lipid bilayers. *Biochemistry* **36(17)**, 5157-5169.
- Klimkait, T., Strebel, K., Hoggan, M.D., Martin, M.A. und Orenstein, J.M. (1990).** The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J. Virol.* **64(2)**, 621-629.
- Kodama, T., Wooley, D.P., Naidu, Y.M., Kestler, H.W. 3rd, Daniel, M.D., Li, Y. und Desrosiers, R.C. (1989).** Significance of premature stop codons in env of simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **63(11)**, 4709-4714.
- Kohl, N.E., Emini, E.A., Schleif, W.A., Davis, L.J., Heimbach, J.C., Dixon, R.A., Scolnick, E.M. und Sigal, I.S. (1988).** Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85(13)**, 4686-4690.
- Kramer, R.A., Schaber, M.D., Skalka, A.M., Ganguly, K., Wong-Staal, F. und Reddy, E.P. (1986).** HTLV-III gag protein is processed in yeast cells by the virus pol-protease. *Science* **231(4745)**, 1580-1584.
- Kräusslich, H.G., Ochsenbauer, C., Traenckner, A.M., Mergener, K., Fäcke, M., Gelderblom, H.R. und Bosch, V. (1993).** Analysis of protein expression and virus-like particle formation in mammalian cell lines stably expressing HIV-1 gag and env gene products with or without active HIV proteinase. *Virology* **192(2)**, 605-617.
- Kwon, D.S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W.A. und Littman, D.R. (2002).** DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* **16(1)**, 135-144.
- Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J. und Hendrickson, W.A. (1998).** Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393(6686)**, 648-659.
- Larder, B.A., Darby, G. und Richman, D.D. (1989).** HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* **243(4899)**, 1731-1734.

- Lasky, L.A., Nakamura, G., Smith, D.H., Fennie, C., Shimasaki, C., Patzer, E., Berman, P., Gregory, T. und Capon, D.J. (1987).** Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* **50(6)**, 975-985.
- Leonard, C.K., Spellman, M.W., Riddle, L., Harris, R.J., Thomas, J.N. und Gregory, T.J. (1990).** Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **265(18)**, 10373-10382.
- Lodge, R., Göttlinger, H., Gabuzda, D., Cohen, E.A. und Lemay, G. (1994).** The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *J. Virol.* **68(8)**, 4857-4861.
- Lodge, R., Lalonde, J.P., Lemay, G. und Cohen, E.A. (1997).** The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *EMBO J.* **16(4)**, 695-705.
- Luban, J. und Goff, S.P. (1994).** Mutational analysis of cis-acting packaging signals in human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J. Virol.* **68(6)**, 3784-3793.
- Luciw, P.A., Shaw, K.E., Shacklett, B.L. und Marthas, M.L. (1998).** Importance of the intracytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus (SIV) envelope glycoprotein for pathogenesis. *Virology* **252(1)**, 9-16.
- Malim, M.H., Tiley, L.S., McCarn, D.F., Rusche, J.R., Hauber, J. und Cullen, B.R. (1990).** HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans-activator to its RNA target sequence. *Cell* **60(4)**, 675-683.
- Mammano, F., Kondo, E., Sodroski, J., Bukovsky, A. und Göttlinger, H.G. (1995).** Rescue of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein mutants by envelope glycoproteins with short cytoplasmic domains. *J. Virol.* **69(6)**, 3824-3830.
- Mammano, F., Salvatori, F., Indraccolo, S., De Rossi, A., Chieco-Bianchi, L. und Göttlinger, H.G. (1997).** Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of Moloney murine leukemia virus particles and gene transfer into CD4+ cells. *J. Virol.* **71(4)**, 3341-3345.
- Mann, D.L., O'Brien, S.J., Gilbert, D.A., Reid, Y., Popovic, M., Read-Connoles, E., Gallo, R.C. und Gazdar, A.F. (1989).** Origin of the HIV-susceptible human CD4+ cell line H9. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **5(3)**, 253-255.
- Mariani, R., Chen, D., Schröfelbauer, B., Navarro, F., König, R., Bollman, B., Münk, C., Nymark-McMahon, H. und Landau, N.R. (2003).** Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* **114(1)**, 21-31.
- Marin, M., Rose, K.M., Kozak, S.L. und Kabat, D. (2003).** HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat. Med.* **9(11)**, 1398-1403.
- Massiah, M.A., Starich, M.R., Paschall, C., Summers, M.F., Christensen, A.M. und Sundquist, W.I. (1994).** Three-dimensional structure of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *J. Mol. Biol.* **244(2)**, 198-223.
- McCallus, D.E., Ugen, K.E., Sato, A.I., Williams, W.V. und Weiner, D.B. (1992).** Construction of a recombinant bacterial human CD4 expression system producing a bioactive CD4 molecule. *Viral Immunol.* **5(2)**, 163-172.
- McCune, J.M., Rabin, L.B., Feinberg, M.B., Lieberman, M., Kosek, J.C., Reyes, G.R. und Weissman, I.L. (1988).** Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* **53(1)**, 55-67.

- McDonald, D., Vodicka, M.A., Lucero, G., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., Emerman, M. und Hope, T.J. (2002).** Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J. Cell. Biol.* **159(3)**, 441-452.
- McDonald, D., Wu, L., Bohks, S.M., KewalRamani, V.N., Unutmaz, D. und Hope, T.J. (2003).** Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* **300(5623)**, 1295-1297.
- Micoli, K.J., Pan, G., Wu, Y., Williams, J.P., Cook, W.J. und McDonald, J.M. (2000).** Requirement of calmodulin binding by HIV-1 gp160 for enhanced FAS-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **275(2)**, 1233-1240.
- Milich, L., Margolin, B. und Swanstrom, R. (1993).** V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein: interpreting sequence variability. *J. Virol.* **67(9)**, 5623-5634.
- Miller, M.A., Garry, R.F., Jaynes, J.M. und Montelaro, R.C. (1991).** A structural correlation between lentivirus transmembrane proteins and natural cytolytic peptides. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **7(6)**, 511-509.
- Miller, M.D., Farnet, C.M. und Bushman, F.D. (1997).** Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J. Virol.* **71(7)**, 5382-5390.
- Miyoshi, I., Kubonishi, I., Yoshimoto, S., Akagi, T., Ohtsuki, Y., Shiraishi, Y., Nagata, K. und Hinuma, Y. (1981).** Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature* **294(5843)**, 770-771.
- Mulligan, M.J., Yamshchikov, G.V., Ritter, G.D. Jr., Gao, F., Jin, M.J., Nail, C.D., Spies, C.P., Hahn, B.H. und Compans, R.W. (1992).** Cytoplasmic domain truncation enhances fusion activity by the exterior glycoprotein complex of human immunodeficiency virus type 2 in selected cell types. *J. Virol.* **66(6)**, 3971-3975.
- Munn, R.J., Marx, P.A., Yamamoto, J.K. und Gardner, M.B. (1985).** Ultrastructural comparison of the retroviruses associated with human and simian acquired immunodeficiency syndromes. *Lab. Invest.* **53(2)**, 194-199.
- Murakami, T. und Freed, E.O. (2000a).** The long cytoplasmic tail of gp41 is required in a cell type-dependent manner for HIV-1 envelope glycoprotein incorporation into virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97(1)**, 343-348.
- Murakami, T. und Freed, E.O. (2000b).** Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail. *J. Virol.* **74(8)**, 3548-3554.
- Murakami, T., Ablan, S., Freed, E.O. und Tanaka, Y. (2004).** Regulation of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated membrane fusion by viral protease activity. *J. Virol.* **78(2)**, 1026-1031.
- Nabel, G. und Baltimore, D. (1987).** An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* **326(6114)**, 711-713.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M. und Trono, D. (1996).** In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272(5259)**, 263-267.
- Neville, M., Stutz, F., Lee, L., Davis, L.I. und Rosbash, M. (1997).** The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr. Biol.* **7(10)**, 767-775.
- Nguyen, D.G. und Hildreth, J.E. (2003).** Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. *Eur. J. Immunol.* **33(2)**, 483-493.

Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M.C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T. und Bonifacino, J.S. (1995). Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* **269**(5232), 1872-1875.

Ohno, H., Aguilar, R.C., Fournier, M.C., Hennecke, S., Cosson, P. und Bonifacino, J.S. (1997). Interaction of endocytic signals from the HIV-1 envelope glycoprotein complex with members of the adaptor medium chain family. *Virology* **238**(2), 305-315.

Oravec, T. und Norcross, M.A. (1993). Costimulatory properties of the human CD4 molecule: enhancement of CD3-induced T cell activation by human immunodeficiency virus type 1 through viral envelope glycoprotein gp120. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **9**(10), 945-955.

Parkin, N.T., Chamorro, M. und Varmus, H.E. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo. *J. Virol.* **66**(8), 5147-5151.

Patel, M., Yanagishita, M., Roderiquez, G., Bou-Habib, D.C., Oravec, T., Hascall, V.C. und Norcross, M.A. (1993). Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **9**(2), 167-174.

Pauwels, R., De Clercq, E., Desmyter, J., Balzarini, J., Goubau, P., Herdewijn, P., Vanderhaeghe, H. und Vandeputte, M. (1987). Sensitive and rapid assay on MT-4 cells for detection of antiviral compounds against the AIDS virus. *J. Virol. Methods* **16**(3), 171-185.

Paxton, W., Connor, R.I. und Landau, N.R. (1993). Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J. Virol.* **67**(12), 7229-7237.

Pear, W.S., Nolan, G., Scott, M. und Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**(18), 8392-8396.

Pepin, J., Morgan, G., Dunn, D., Gevao, S., Mendy, M., Gaye, I., Scollen, N., Tedder, R. und Whittle, H. (1991). HIV-2-induced immunosuppression among asymptomatic West African prostitutes: evidence that HIV-2 is pathogenic, but less so than HIV-1. *AIDS* **5**(10), 1165-1172.

Perez, L.G., Davis, G.L. und Hunter, E. (1987). Mutants of the Rous sarcoma virus envelope glycoprotein that lack the transmembrane anchor and cytoplasmic domains: analysis of intracellular transport and assembly into virions. *J. Virol.* **61**(10), 2981-2988.

Phillips, D.M. (1994). The role of cell-to-cell transmission in HIV infection. *AIDS* **8**(6), 719-731.

Pierson, T.C. und Doms, R.W. (2003). HIV-1 entry and its inhibition. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **281**, 1-27.

Piguet, V. und Sattentau, Q. (2004). Dangerous liaisons at the virological synapse. *J. Clin. Invest.* **114**(5), 605-610.

Piller, S.C., Dubay, J.W., Derdeyn, C.A. und Hunter, E. (2000). Mutational analysis of conserved domains within the cytoplasmic tail of gp41 from human immunodeficiency virus type 1: effects on glycoprotein incorporation and infectivity. *J. Virol.* **74**(24), 11717-11723.

Pique, C., Pham, D., Tursz und T., Dokhelar, M.C. (1993). The cytoplasmic domain of the human T-cell leukemia virus type I envelope can modulate envelope functions in a cell type-dependent manner. *J. Virol.* **67**(1), 557-561.

Planelles, V., Jowett, J.B., Li, Q.X., Xie, Y., Hahn, B. und Chen, I.S. (1996). Vpr-induced cell cycle arrest is conserved among primate lentiviruses. *J. Virol.* **70**(4), 2516-2524.

- Platt, E.J., Wehrly, K., Kuhmann, S.E., Chesebro, B. und Kabat, D. (1998).** Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **72(4)**, 2855-2864.
- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D. und Gallo, R.C. (1980).** Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77(12)**, 7415-7419.
- Popovic, M., Read-Connole, E. und Gallo, R.C. (1984a).** T4 positive human neoplastic cell lines susceptible to and permissive for HTLV-III. *Lancet* **2(8417-8418)**, 1472-1473.
- Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E. und Gallo, R.C. (1984b).** Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224(4648)**, 497-500.
- Price, D.H. (2000).** P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* **20(8)**, 2629-2634.
- Ratner, L., Fisher, A., Jagodzinski, L.L., Mitsuya, H., Liou, R.S., Gallo, R.C. und Wong-Staal, F. (1987).** Complete nucleotide sequences of functional clones of the AIDS virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **3(1)**, 57-69.
- Ritter, G.D. Jr., Mulligan, M.J., Lydy, S.L. und Compans, R.W. (1993).** Cell fusion activity of the simian immunodeficiency virus envelope protein is modulated by the intracytoplasmic domain. *Virology* **197(1)**, 255-264.
- Roderiquez, G., Oravec, T., Yanagishita, M., Bou-Habib, D.C., Mostowski, H. und Norcross, M.A. (1995).** Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. *J. Virol.* **69(4)**, 2233-2239.
- Rogel, M.E., Wu, L.I. und Emerman, M. (1995).** The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *J. Virol.* **69(2)**, 882-888.
- Rous, P. (1911).** A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* **13**, 397-411.
- Rousso, I., Mixon, M.B., Chen, B.K. und Kim, P.S. (2002).** Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97(25)**, 13523-13525.
- Rowell, J.F., Stanhope, P.E. und Siliciano, R.F. (1995).** Endocytosis of endogenously synthesized HIV-1 envelope protein. Mechanism and role in processing for association with class II MHC. *J. Immunol.* **155(1)**, 473-488.
- Salahuddin, S.Z., Markham, P.D., Wong-Staal, F., Franchini, G., Kalyanaraman, V.S. und Gallo, R.C. (1983).** Restricted expression of human T-cell leukemia-lymphoma virus (HTLV) in transformed human umbilical cord blood lymphocytes. *Virology* **129(1)**, 51-64.
- Saltarelli, M.J., Hadziyannis, E., Hart, C.E., Harrison, J.V., Felber, B.K., Spira, T.J. und Pavlakis, G.N. (1996).** Analysis of human immunodeficiency virus type 1 mRNA splicing patterns during disease progression in peripheral blood mononuclear cells from infected individuals. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12(15)**, 1443-1456.
- Sanders, R.W., de Jong, E.C., Baldwin, C.E., Schuitemaker, J.H., Kapsenberg, M.L., Berkhout, B. (2002).** Differential transmission of human immunodeficiency virus type 1 by distinct subsets of effector dendritic cells. *J. Virol.* **76(15)**, 7812-7821.
- Saphire, A.C., Bobardt, M.D. und Gallay, P.A. (1999).** Host cyclophilin A mediates HIV-1 attachment to target cells via heparans. *EMBO J.* **18(23)**, 6771-6785.

- Sattentau, Q.J. und Moore, J.P. (1991).** Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J. Exp. Med.* **174**(2), 407-15.
- Schnierle, B.S., Stitz, J., Bosch, V., Nocken, F., Merget-Millitzer, H., Engelstadter, M., Kurth, R., Groner, B. und Cichutek, K. (1997).** Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of HIV generates a retroviral vector with specificity of infection for CD4-expressing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**(16), 8640-8645.
- Schröder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R. und Bushman, F. (2002).** HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**(4), 521-529.
- Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D. und Malim, M.H. (2002).** Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**(6898), 646-650.
- Shimizu, H., Morikawa, S., Yamaguchi, K., Tsuchie, H., Hachimori, K., Ushijima, H. und Kitamura, T. (1990).** Shorter size of transmembrane glycoprotein of an HIV-1 isolate. *AIDS* **4**(6), 575-576.
- Shimizu, H., Hasebe, F., Tsuchie, H., Morikawa, S., Ushijima, H. und Kitamura, T. (1992).** Analysis of a human immunodeficiency virus type 1 isolate carrying a truncated transmembrane glycoprotein. *Virology* **189**(2), 534-546.
- Sibley, L.D. (2004).** Intracellular parasite invasion strategies. *Science* **304**(5668), 248-253.
- Sodroski, J.G., Rosen, C.A. und Haseltine, W.A. (1984).** Trans-acting transcriptional activation of the long terminal repeat of human T lymphotropic viruses in infected cells. *Science* **225**(4660), 381-385.
- Somasundaran, M. und Robinson, H.L. (1987).** A major mechanism of human immunodeficiency virus-induced cell killing does not involve cell fusion. *J. Virol.* **61**(10), 3114-3119.
- Spies, C.P. und Compans, R.W. (1994).** Effects of cytoplasmic domain length on cell surface expression and syncytium-forming capacity of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *Virology* **203**(1), 8-19.
- Spies, C.P., Ritter, G.D. Jr., Mulligan, M.J. und Compans, R.W. (1994).** Truncation of the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein alters the conformation of the external domain. *J. Virol.* **68**(2), 585-591.
- Srinivas, S.K., Srinivas, R.V., Anantharamaiah, G.M., Segrest, J.P. und Compans, R.W. (1992).** Membrane interactions of synthetic peptides corresponding to amphipathic helical segments of the human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **267**(10), 7121-7127.
- Srinivas, S.K., Srinivas, R.V., Anantharamaiah, G.M., Compans, R.W. und Segrest, J.P. (1993).** Cytosolic domain of the human immunodeficiency virus envelope glycoproteins binds to calmodulin and inhibits calmodulin-regulated proteins. *J. Biol. Chem.* **268**(30), 22895-22899.
- Stamenkovic, I. und Seed, B. (1990).** The B-cell antigen CD22 mediates monocyte and erythrocyte adhesion. *Nature* **345**(6270), 74-77.
- Starcich, B.R., Hahn, B.H., Shaw, G.M., McNeely, P.D., Modrow, S., Wolf, H., Parks, E.S., Parks, W.P., Josephs, S.F. und Gallo, R.C. (1986).** Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* **45**(5), 637-648.
- Temin, H.M. und Mizutani, S. (1970).** RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**(252), 1211-1213.
- Trkola, A., Dragic, T., Arthos, J., Binley, J.M., Olson, W.C., Allaway, G.P., Cheng-Mayer, C., Robinson, J., Maddon, P.J. und Moore, J.P. (1996).** CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* **384**(6605), 184-187.

Turville, S.G., Cameron, P.U., Handley, A., Lin, G., Pohlmann, S., Doms, R.W. und Cunningham, A.L. (2002). Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat. Immunol.* **3(10)**, 975-983.

Veronese, F.D., DeVico, A.L., Copeland, T.D., Oroszlan, S., Gallo, R.C. und Sarngadharan MG. (1985). Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelope gene. *Science* **229(4720)**, 1402-1405.

Veronese, F.D., Copeland, T.D., Oroszlan, S., Gallo, R.C. und Sarngadharan, M.G. (1988). Biochemical and immunological analysis of human immunodeficiency virus gag gene products p17 and p24. *J. Virol.* **62(3)**, 795-801.

Waterfield, M.D., Mayes, E.L., Stroobant, P., Bennet, P.L., Young, S., Goodfellow, P.N., Banting, G.S. & Ozanne, B. (1982). A monoclonal antibody to the human epidermal growth factor receptor. *J. Cell. Biochem.* **20(2)**, 149-161.

Wei, P., Garber, M.E., Fang, S.M., Fischer, W.H. und Jones, K.A. (1998). A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* **92(4)**, 451-462.

Wei, X., Decker, J.M., Liu, H., Zhang, Z., Arani, R.B., Kilby, J.M., Saag, M.S., Wu, X., Shaw, G.M. und Kappes, J.C. (2002). Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46(6)**, 1896-1905.

Weinberg, J.B., Matthews, T.J., Cullen, B.R. und Malim, M.H. (1991). Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. *J. Exp. Med.* **174(6)**, 1477-1482.

Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S.C., Skehel, J.J. und Wiley, D.C. (1997). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387(6631)**, 426-430.

West, J.T., Weldon, S.K., Wyss, S., Lin, X., Yu, Q., Thali, M. und Hunter, E. (2002). Mutation of the dominant endocytosis motif in human immunodeficiency virus type 1 gp41 can complement matrix mutations without increasing Env incorporation. *J. Virol.* **76(7)**, 3338-3349.

Wilcox, C., Hu, J.S. und Olson, E.N. (1987). Acylation of proteins with myristic acid occurs cotranslationally. *Science* **238(4831)**, 1275-1278.

Wilk T., Pfeiffer, T. und Bosch, V. (1992). Retained *in vitro* infectivity and cytopathogenicity of HIV-1 despite truncation of the C-terminal tail of the env gene product. *Virology* **189(1)**, 167-177.

Wilk T., Pfeiffer, T., Bukovsky, A., Moldenhauer, G. und Bosch, V. (1996). Glycoprotein incorporation and HIV-1 infectivity despite exchange of the gp160 membrane-spanning domain. *Virology* **218(1)**, 269-274.

Willey, R.L., Bonifacino, J.S., Potts, B.J., Martin, M.A. und Klausner, R.D. (1988). Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85(24)**, 9580-9584.

Willey, R.L., Klimkait, T., Frucht, D.M., Bonifacino, J.S. und Martin, M.A. (1991). Mutations within the human immunodeficiency virus type 1 gp160 envelope glycoprotein alter its intracellular transport and processing. *Virology* **184(1)**, 319-329.

Willey, R.L., Maldarelli, F., Martin, M.A. und Strebel, K. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J. Virol.* **66(12)**, 7193-7200.

Wyatt, R., Kwong, P.D., Desjardins, E., Sweet, R.W., Robinson, J., Hendrickson, W.A. und Sodroski, J.G. (1998). The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **393(6686)**, 705-711.

- Wyatt, R. und Sodroski, J. (1998).** The HIV-1 Envelope Glycoproteins: Fusogens, Antigens, and Immunogens. *Science* **280(5371)**, 1884-1888.
- Wyma, D.J., Kotov, A. und Aiken, C. (2000).** Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.* **74(20)**, 9381-9387.
- Wyma, D.J., Jiang, J., Shi, J., Zhou, J., Lineberger, J.E., Miller, M.D. und Aiken, C. (2004).** Coupling of human immunodeficiency virus type 1 fusion to virion maturation: a novel role of the gp41 cytoplasmic tail. *J. Virol.* **78(7)**, 3429-3435.
- Wyss, S., Berlioz-Torrent, C., Boge, M., Blot, G., Honing, S., Benarous, R. und Thali, M. (2001).** The highly conserved C-terminal dileucine motif in the cytosolic domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein is critical for its association with the AP-1 clathrin adaptor. *J. Virol.* **75(6)**, 2982-2992.
- Yu, X., Yu, Q.C., Lee, T.H. und Essex, M. (1992).** The C terminus of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein is involved in early steps of the virus life cycle. *J. Virol.* **66(9)**, 5667-5670.
- Yu, X., Yuan, X., McLane, M.F., Lee, T.H. und Essex, M. (1993).** Mutations in the cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein impair the incorporation of Env proteins into mature virions. *J. Virol.* **67(1)**, 213-221.
- Yuste, E., Reeves, J.D., Doms, R.W. und Desrosiers, R.C. (2004).** Modulation of Env content in virions of simian immunodeficiency virus: correlation with cell surface expression and virion infectivity. *J. Virol.* **78(13)**, 6775-6785.
- Zhang, H., Wang, L., Kao, S., Whitehead, I.P., Hart, M.J., Liu, B., Duus, K., BurrIDGE, K., Der, C.J. und Su, L. (1999).** Functional interaction between the cytoplasmic leucine-zipper domain of HIV-1 gp41 and p115-RhoGEF. *Curr. Biol.* **9(21)**, 1271-1274.
- Zhang, H., Yang, B., Pomerantz, R.J., Zhang, C., Arunachalam, S.C. und Gao, L. (2003).** The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* **424(6944)**, 94-98.
- Zhang, Y. J., Hatzioannou, T., Zang, T., Braaten, D., Luban, J., Goff, S.P. und Bieniasz, P.D. (2002).** Envelope-dependent, cyclophilin-independent effects of glycosaminoglycans on human immunodeficiency virus type 1 attachment and infection. *J. Virol.* **76(12)**, 6332-6343.
- Zhou, Q., Chen, D., Pierstorff, E. und Luo, K. (1998).** Transcription elongation factor P-TEFb mediates Tat activation of HIV-1 transcription at multiple stages. *EMBO J.* **17(13)**, 3681-3691.
- Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., Mathews, M.B. und Price, D.H. (1997).** Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev.* **11(20)**, 2622-2632.
- Zingler, K. und Littman, D.R. (1993).** Truncation of the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein increases env incorporation into particles and fusogenicity and infectivity. *J. Virol.* **67(5)**, 2824-2831.
- Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L. und Trono, D. (1997).** Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat. Biotechnol.* **15(9)**, 871-875.

